

Aus der Milchabteilung (Leiter: ORVR Dr. G. Kielwein)
des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf
Vorstand: Reg. Vet. Direktor Professor Dr. K. Dedié

UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN UND ZUR CHARAKTERISIERUNG MILCHHYGIENISCH BEDEUTUNGSVOLLER PSEUDOMONADEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Johann Till
Tierarzt aus Ofalu/Ungarn

Gießen 1969

Aus der Milchabteilung (Leiter: ORVR Dr. G. Kielwein)
des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf
Vorstand: Reg. Vet. Direktor Professor Dr. K. Dedié

UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN UND ZUR CHARAKTERISIERUNG MILCHHYGIENISCH BEDEUTUNGSVOLLER PSEUDOMONADEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Johann Till

Tierarzt aus Ofalu/Ungarn

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Jul 1969



MEINEN LIEBEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1.0 Einleitung	1
2.0 Literaturübersicht	3
2.1. Allgemeines zum Genus Pseudomonas	2
2.2 Das Vorkommen von Pseudomonaden	2
2.3 Die Charakterisierung der Pseudomonaden	8
3.0 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.11 Herkunft der Kulturen	17
3.12 Nährböden	18
3.3.2 Methoden	19
3.21 Bestimmung der Anwachsrate auf Chinasäureagar	19
3.22 Technik der Isolierung von Pseudomonas-Kulturen	20
3.23 Kulturmorphologie und Hämolysebildung	20
3.24 Zellmorphologie	20
3.25 Beweglichkeitsprüfung	20
3.26 Oxydase- und Cytochromoxydasereaktion	21
3.27 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen	21
3.28 Farbstoffnachweis	21
3.29 Prüfung auf Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung	21
3.211 Wachstum in Lackmusmilch	21
3.212 Eigelbreaktion	21
3.213 Prüfung auf Kaseolyse	22
3.214 Wachstum im flüssigen Chinasäure- nährmedium	22
3.215 Wachstum auf Simmon's Zitratmedium	22
3.216 Nitratreduktion	22
3.217 Ureasenachweis	22

	Seite
3.219 Nachweis von Schwefelwasserstoff	23
3.221 Prüfung auf Katalasebildung	23
3.222 Peroxydasenachweis	23
3.223 Prüfung auf Lipolyse	23
3.224 Prüfung auf Spaltung von Kohlenhydraten und Alkoholen	23
3.225 Prüfung auf Verwertung von Kohlen- hydraten und Alkoholen als einzige Kohlenstoffquelle	24
3.226 Resistenz gegenüber Antibiotika	24
4.0 Ergebnisse	25
4.1 Vorversuch	25
4.2 Hauptversuch	26
4.21 Vorkommen von Pseudomonaden in Rohmilch, Brauchwasser und Melkgeräten	26
4.22 Charakterisierung der Vergleichsstämme	27
4.23 Zusammenfassende Darstellung der Charakterisierungsergebnisse	28
4.24 Versuch einer Gruppierung der charakterisierten Pseudomonaden	32
4.241 Gruppe I - Ps. aeruginosa	32
4.242 Gruppe II - Ps. fluorescens	33
4.243 Gruppe III - Ps. putida	36
4.244 Gruppe IV - Ps. taetrolens	39
4.245 Gruppe V - Ps. fragi	40
4.246 Gruppe VI - Ps. species	41
4.247 Nachtrag	43
4.248 Quantitative Katalasebestimmung	44
4.249 Resistenz gegenüber Antibiotika	45
4.25 Die Häufigkeit der Pseudomonas-Arten in Rohmilch	45
5.0 Besprechung der Ergebnisse	48
6.0 Zusammenfassung	58
7.0 Literaturverzeichnis	59
Anhang (Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	64
Lebenslauf	

E I N L E I T U N G

Die Keimflora der handermolkenen Milch besteht vorwiegend aus Streptokokken, Laktobazillen, Mikrokokken, Hefen, Schimmelpilzen und in wechselnder Zahl aus Enterobakterien. Die Keimflora der maschinermolkenen Milch dagegen wird durch einen hohen Anteil an gramnegativen Keimen gekennzeichnet, wobei häufig nicht zu den Enterobacteriaceae gehörende gramnegative psychrotrophe Keime im Vordergrund stehen. Die überwiegende Zahl dieser Keime gehört der Familie Pseudomonadaceae an.

Die Pseudomonaden sind in der Natur mit zahlreichen Arten weit verbreitet und spielen im Stoffwechselgeschehen von Boden und Wasser eine große Rolle. Ihre Bedeutung für die Lebensmittelhygiene ist in ihrer starken Fermentaktivität und ihrem Vermögen, auch bei niederen Temperaturen zu wachsen, begründet. Als Krankheitserreger bei Mensch und Tier gewinnt Pseudomonas aeruginosa zunehmend an Bedeutung. Die in der Milch anzutreffenden Pseudomonaden entstammen in erster Linie den mit Milch in Berührung kommenden Gerätschaften. Eine Kontamination der Milch mit primärem Ausgang vom Euter ist ebenfalls möglich.

Die Kontamination der Milch und der Milchprodukte durch Pseudomonaden hat in erster Linie Geruchs- und Geschmacksveränderungen zur Folge, die durch die proteolytische und lipolytische Aktivität dieser Keime hervorgerufen werden. Daneben können auch Säuerungsfehler bei Milchprodukten auf eine erhebliche Pseudomonas-Kontamination der verarbeiteten Milch zurückgeführt werden.

Zur Beurteilung der milchhygienischen Bedeutung der Pseudomonaden ist eine genaue Kenntnis über das Vor-

kommen und über die Eigenschaften der in Milch zu erwartenden Pseudomonaden notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Beitrag zur milchhygienischen Bewertung der Pseudomonaden zu leisten. Hierzu sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Isolierung und Charakterisierung einer Anzahl von Pseudomonas-Kulturen aus Milch, Melkgeräten und dem zur Reinigung der Melkgeräte verwandten Wasser (Brauchwasser) in Milcherzeugerbetrieben. Die Kulturen sollten außerdem mit bekannten Pseudomonasstämmen verglichen werden.
2. Untersuchungen über die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Pseudomonas-Arten in Rohmilch.

2.0

L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

2.1. Allgemeines zum Genus Pseudomonas

Die Gattung *Pseudomonas* gehört der Familie *Pseudomonadaceae* an.

HAYNES und BURKHOLDER (4) charakterisieren die Gattung *Pseudomonas* in Bergey's Manual wie folgt:

..."Pseudomonaden sind entweder monotrich oder lophotrich begeißelt oder sie sind unbewegliche, gramnegative Bakterien. Sie bilden häufig ein diffusibles, fluoreszierendes Pigment von grüner, blauer, violetter, lila, rosa, gelber oder anderer Farbe. Die meisten Arten oxydieren Glukose zu 2-Ketoglukonsäure oder zu Intermediärprodukten. Laktose wird im allgemeinen nicht oxydiert. Nitrat wird häufig zu Nitrit, Ammoniak oder zu Stickstoff reduziert. Einige Arten spalten Fett und/oder Kohlenhydrate. Die Trennungslinie zwischen den geraden *Pseudomonas*-stäbchen und den gebogenen Vibrionen ist nicht scharf. Gelegentlich können gebogene Stäbchen bei einzelnen Spezies auftreten. Die Trennung ist durch Anwendung von Antibiotika und Vibriostatika möglich"...

Die *Pseudomonaden* zeigen eine positive Cytochromoxydase-reaktion und spalten Glukose oxydativ. Nach DE LEY (9) ermöglichen diese Eigenschaften eine Abgrenzung des Genus *Pseudomonas* von anderen Genera. LEIFSON (23) schlägt zur Trennung der Genera *Pseudomonas* und *Vibrio* die Prüfung auf Glukosespaltung vor, da Vibrionen Glukose fermentativ spalten.

2.2 Das Vorkommen von Pseudomonaden

2.21 Allgemeines zum Vorkommen von Pseudomonaden

Die *Pseudomonaden* sind Boden- und Wasserkeime. BERGEY'S MANUAL (4) gibt als Hauptfundorte den Boden, See- und verunreinigtes Süßwasser, die Pflanzenwelt und Tiere an. Auch KLINGE (29) bezeichnet die *Pseudomonaden* als

Boden- und Wasserkeime. Diese Bezeichnung wird durch die Untersuchungsergebnisse von KNORR, HAAS und KNORR (32) und SELENKA (55), die über eine Zunahme der Pseudomonadenfunde im natürlichen Grundwasser, im Oberflächenwasser und im Trinkwasser berichten, unterstützt. BEYTHIEN (3) konnte in 71 der untersuchten 103 Brauchwasserproben aus Milcherzeugerbetrieben Pseudomonaden nachweisen.

Auch in Milcherzeugerbetrieben wurden Pseudomonaden gefunden. So wies THOMAS (60) auf der Euterhaut, auf Futtermitteln und in der Stallluft Pseudomonaden nach. In 50 % der von ihm überprüften Absaugleitungen fand er Pseudomonaden. Bei der Überprüfung von 61 Melkmaschinen in Milcherzeugerbetrieben, die wegen der bakteriologischen Qualität ihrer Anlieferungsmilch beanstandet wurden, fand KIELWEIN (25) in 51 (84 %) der entnommenen Tupferproben Pseudomonaden allein oder zusammen mit anderen Bakterien. Die Feststellung von Pseudomonaden in 78 von 125 Desinfektionsgeräten verdient besondere Beachtung.

Nach GYLLENBERG und EKLUND (20) besteht der überwiegende Anteil der psychrotrophen Bakterien in der Rohmilch aus Pseudomonaden. Auch KIELWEIN (25) weist darauf hin, daß in Roh-, aber auch in pasteurisierter Trinkmilch mit gehäuftem Auftreten von Pseudomonaden gerechnet werden muß. Er fand in 174 (68,4 %) von 254 Rohmilchproben mehr als 100 Pseudomonaden/ml. Die Proben mit mehr als 10^3 - 10^5 Pseudomonaden je ml Rohmilch wiesen häufig auch eine hohe Gesamtkeimzahl und einen hohen Colititer auf. Von den untersuchten Trinkmilchproben enthielten 23,9 % mehr als 100 Pseudomonaden/ml. Aus den in Molkereien entnommenen Trinkmilchproben konnten in 13 % der Fälle Pseudomonaden isoliert werden, während die in Milchgeschäften entnommene offene Trinkmilch in 46 % mit Pseudomonaden kontaminiert war. In Schlagsahne und Vorzugsmilch gelang ebenfalls der Nachweis von Pseudomonaden.

Auch für die Fleischhygiene sind die Pseudomonaden von Interesse. So wies BRUZYNSKA (6) nach, daß frisches, bei 4°C aufbewahrtes Fleisch erheblich mit Pseudomonaden kontaminiert ist. Auch in Proben aus Fleisch, das während der Kühlagerung in Verderbnis übergegangen war, stellte der Autor Pseudomonaden als Hauptanteil der Keimflora fest. Ebenso konnte er aus Gefrierfleisch, das bei -14°C gelagert wurde, Pseudomonaden isolieren. KIELWEIN und STEHLE (27) fanden, daß die Keimflora bei Geflügelfleisch, das bei -8°C gelagert worden und verdorben war, nahezu ausschließlich aus Pseudomonaden bestand.

2.22 Das Vorkommen von Pseudomonas aeruginosa

In BERGEY'S MANUAL (4) werden als Fundorte von Ps. aeruginosa eiternde Wunden, verunreinigtes Wasser und Abwasser angegeben. RINGEN und DRAKE (53) und SELENKA (55) weisen auf das gehäufte Vorkommen dieses Keimes im Abwasser, das durch menschliche oder tierische Fäkalien verunreinigt wurde, hin. 90 % der von RINGEN und DRAKE (53) untersuchten 52 Abwasserproben enthielten Ps. aeruginosa. Über das Vorkommen von Ps. aeruginosa in abwasserführenden Flüssen und im Trinkwasser berichten KNORR, HAAS und KNORR (32). Auch GRÜN (17) fand als Hauptreservoir für Ps. pyocyanea stagnierendes Wasser sowie Leitungswasser. Aus allen 50 von ihm untersuchten Klinikwaschbecken konnte er diese Keime isolieren.

Die Kontamination der Milch und Milchprodukte mit Ps. aeruginosa ist wegen der potentiellen Pathogenität dieser Keime für den Menschen von besonderer Bedeutung. Bei der Untersuchung von 1022 Rohmilchproben fanden KIELWEIN und Mitarbeiter (26) in 69 (6,7 %) der Proben Ps. aeruginosa. Demgegenüber waren die von GRÜN (18) untersuchten 45 Rohmilchproben zu 86,2 % mit Ps. pyocyanea befallt. KRÜGER und FRANK (40) wiesen über den TTC-Nährboden in

einer Vorzugsmilchprobe Ps. aeruginosa nach. Im Zusammenhang mit einem Ps. aeruginosa-Befund in Konsummilch weisen THÖRNE und ANDREN (61) auf die immer häufiger auftretende Ps. aeruginosa-Infektion bei Mensch und Tier hin.

Als Mastitiserreger wurde diese Spezies von NEUMANN und SEELIG (44) beschrieben. Die Verlaufsformen der durch Ps. aeruginosa verursachten Mastitis können verschieden sein. So berichtet RADELLI und PERINI (50) von einer katarrhalischen Mastitis bei 16 Kühen, die nach der i.m.m. Applikation von Polymyxin B innerhalb 24 - 48 Stunden abklang. THÖRNE und HARKANNSON (62) berichten von einer Zunahme der akut verlaufenden Ps. aeruginosa-Mastitis in Schweden. Im Laufe eines Jahres verlor ein Betrieb mit 75 Kühen infolge akut verlaufender, durch Ps. aeruginosa verursachter Mastitiden 15 Tiere. NILSON und THÖRNE (47) stellten in Mittelschweden während einer zehnjährigen Beobachtungsperiode Untersuchungen über die Häufigkeit der akuten Ps. aeruginosa-Mastitis an. In 46 von 509 der Euterkontrolle angeschlossenen Beständen wurden durch Ps. aeruginosa verursachte, akute Mastitiden beobachtet. Der Prozentsatz der erkrankten Kühe betrug 1,33 %. Die Autoren weisen darauf hin, daß in manchen Herden die Pseudomonas-Mastitis trotz der niedrigen Erkrankungsziffer ein ernsthaftes Problem darstellt. In Ungarn wurde in Großbetrieben ebenfalls ein gehäuftes Auftreten der Ps. aeruginosa-Mastitis beobachtet. FORRAI und SZAZADOS (11) beschreiben 3 mit Septikämie verbundene Pseudomonas-Mastitiden. Sie sind der Ansicht, daß diese Krankheit vorwiegend in Betrieben mit maschineller Milchgewinnung und mangelnder Milch- und Stallhygiene zu beobachten ist. Perakut verlaufende Pseudomonas-Mastitiden wurden von WEIGT und FRERKING (65) beobachtet. Durch bakteriologische Umgebungsuntersuchungen konnten die Autoren nachweisen, daß als Infektionsquellen mit Ps. aeruginosa kontaminierte Zitzenbecher anzusprechen sind.

Die bei Bullen häufig zu beobachtende Besiedlung des Präputialsackes und der Urethra mit Ps.aeruginosa wiesen BAIER und Mitarbeiter (1) bei 18 von 34 Bullen nach. Während GÖTZE (16) und GÖRTTLER (15) die Ansicht vertreten, daß die Befruchtungsfähigkeit mit Ps.aeruginosa kontaminierten Spermas schon nach 2 - 3 Tagen nachläßt, konnten BAIER und Mitarbeiter (1) keine schädigenden Einflüsse feststellen. GÖTZE (16) berichtet, daß bei Kühen, deren Genitaltrakt mit Ps.aeruginosa besiedelt ist, die Brunst längere Zeit ausbleibt und die Tiere nicht trächtig werden. Er schätzt den Anteil der durch "Pseudomoniasis genitalis" verursachten Fruchtbarkeitsstörungen im Jahre 1951 in Deutschland auf 10 %.

Über Ps. aeruginosa-Infektionen beim Schwein, insbesondere bei Ferkeln, berichtet KOSKE (33). Er fand bei den erkrankten Schweinen eine meist tödlich verlaufende Rhinitis und Meningitis hämorrhagica. Auch MEYER (43) beschreibt einen Fall von "Pyocyaneussepsis" bei einem Ferkel und beruft sich auf weitere, früher beobachtete Fälle.

Die zahlreichen Berichte über das Vorkommen von Ps. aeruginosa beim Menschen lassen sich kaum noch übersehen. CASELITZ (7) führt als bevorzugten Sitz beim Menschen die Haut der Genital- und Analgegend, die Inguinalfalten und die Achselhöhle auf. Kinder im Säuglingsalter sind durch Ps. aeruginosa besonders gefährdet. So berichten WEIDENMÜLLER (64), WÖCKEL und EGGERS (66) und CASELITZ (7) über epidemisch, oft mit hoher Mortalität verlaufenden Diarrhöen und Enteritiden auf Säuglingsstationen. Nach CASELITZ (8) sind die häufigsten durch Ps. aeruginosa verursachten Erkrankungen Gastroenteritis, Meningitis, Empyeme, Otitiden, Conjunctivitis, Infektionen der Harnwege, der Haut, des Respirationstraktes sowie Allgemeininfektionen.

2.23 Das Vorkommen von Ps. fluorescens und von anderen Pseudomonaden

BERGEY'S MANUAL (4) gibt als Fundorte von Ps. fluorescens Wasser und Fäces an. Auch KLINGE (30), KNORR, HAAS und KNORR (32) sowie DEUFEL (10) berichten über den Nachweis von Ps. fluorescens im Wasser. NIKODEMUSZ (45) beschreibt eine Lebensmittelvergiftung, bei der als Infektionsquelle mit Ps. fluorescens kontaminiertes Karottengemüse ermittelt werden konnte.

Über das Vorkommen von Ps. fluorescens in Rohmilch berichten GYLLENBERG und EKLUND (20). REHER (51) fand diesen Keim in 38 (76 %) der von ihm untersuchten 50 Vorzugsmilchproben.

In BERGEY'S MANUAL (4) sind als Fundorte von Ps. putida in Fäulnis übergegangene Substanzen und das Wasser genannt. Auch von KLINGE (29) wird Ps. putida als Wasserkkeim bezeichnet. DEUFEL (10) fand Ps. putida bei der Untersuchung von Wasser aus dem Bodensee in 6 - 8 % der Proben. Auch aus Urin, Sputum, Blut sowie von Abstrichen medizinischer Instrumente wurde Ps. putida isoliert (JESSEN (24)).

BERGEY'S MANUAL (4) gibt die Milch und schimmliche Eier als Fundort von Ps. taetrolens an. Die von JESSEN (24) charakterisierten Ps. taetrolens-Kulturen stammten aus See- und Sumpfwasser.

Ps. fragi wird nach BERGEY'S MANUAL (4) in Milch und Milchprodukten gefunden. Auch GYLLENBERG und EKLUND (20) gelang die Isolierung von Ps. fragi aus Milch.

2.3 Charakterisierung der Pseudomonaden

2.31 Allgemeines zur Charakterisierung der Gattung Pseudomonas

In den vergangenen zehn bis zwanzig Jahren befaßten sich

zahlreiche Autoren mit der taxonomischen Eingruppierung der Pseudomonaden. Dabei trennten einige Autoren (zit. n. KRASSILNIKOV (39)) die phytopathogenen Formen, die die Mehrzahl der Pseudomonaden ausmachen, von den tierpathogenen und saprophytären Arten als eine besondere Gattung - *Phytomonas* - ab. Hierfür besteht jedoch nach der Auffassung von KRASSILNIKOV (39) auf Grund mikrobiologischer Gesichtspunkte keine Berechtigung. Auch BERGEY'S MANUAL (4) reiht die Vertreter des Genus *Pseudomonas* unabhängig von den biochemischen Leistungen in folgende zwei Gruppen ein:

1. Boden- und Wasserkeime, zum Teil pathogen für kalt- und warmblütige Tiere;
2. Pflanzenpathogene Pseudomonaden.

In BERGEY'S MANUAL (4) werden 149, bei KRASSILNIKOV (39) über 200, und bei PREVOT (48) 104 Spezies der Gattung *Pseudomonas* aufgeführt. Nach JESSEN (24) besteht ein Mißverhältnis zwischen der geringen Zahl der abweichenden Eigenschaften und der großen Zahl der Arten. Nach seiner Meinung bestehen fließende Übergänge in den Eigenschaften der einzelnen Arten. DE LEY (9) sieht die Ursache für die Aufführung so zahlreicher Arten darin, daß auch bei geringer Abweichung in den Eigenschaften einzelner Kulturen jeweils neue Arten aufgestellt wurden.

Die Charakterisierung der Arten wird von GABY (13) als schwierig bezeichnet, da die Kulturmorphologie, die Begeißelung und die Fähigkeit, Farbstoffe zu bilden, variabel sind. Auch KORTH (34) kommt nach umfangreichen Studien über die Farbstoffbildung im Genus *Pseudomonas* zu der Auffassung, daß eine Unterteilung in Spezies nur auf Grund der Fähigkeit, verschiedene Farbstoffe zu bilden, fragwürdig ist. Die einzelnen Stämme verlieren leicht die Fähigkeit, ihr charakteristisches Pigment zu bilden, und andererseits ist noch nicht geklärt, ob andere Spezies unter geeigneten Bedingungen nicht auch die gleichen Farbstoffe zu bilden vermögen.

SELEN und STARK (54) prüften 200 Pseudomonaden-Kulturen auf ihre biochemischen Eigenschaften. Sie konnten die Kulturen in 14 Gruppen einteilen, wenn sie nur einige wichtige Eigenschaften - Gelatinespaltung, Verhalten in der Lackmusmilch, Wachstumstemperaturen - als entscheidende Kriterien beachteten. KLINGE (29) untersuchte 48 Pseudomonas-Kulturen. Auf Grund des Ausfalls der Gelbreaktion und der Gelatinespaltung konnte er nur 3 Arten unterscheiden: Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens und Ps. putida. Auch LYSENKO (42) hält die Abtrennung von Ps. fluorescens und Ps. putida auf Grund der Proteolyse und der Verwertung von Kohlenhydraten als alleinige Kohlenstoffquelle für notwendig. Seine Untersuchungen zeigen jedoch, daß eine ganze Reihe bisher definierter Spezies nicht als selbständige Arten angesehen werden können. Nach gewissenhafter Prüfung von 46 identifizierten Arten blieben nur 18 als selbständig übrig. RHODES (52) gibt eine ausführliche Beschreibung des Genus Pseudomonas. Eine Reihe von Eigenschaften fand er bei allen Spezies gleich, während andere Reaktionen unterschiedlich ausfielen. Ps. aeruginosa und die pflanzenpathogenen Pseudomonaden unterschieden sich mehr oder weniger von den restlichen Boden- bzw. Wasserpseudomonaden. Diese restliche Gruppe von 134 Kulturen hatte nur sehr wenige Eigenschaften mit den anderen Pseudomonaden gemeinsam. Er sah diese geschlossene Gruppe als Ps. fluorescens an und verneinte die Rechtfertigung einer weiteren Unterteilung.

BEER (2) bildet nach umfangreichen morphologischen und biochemischen Studien nur folgende drei Gruppen in der Gattung Pseudomonas: 1. Ps. aeruginosa, 2. Ps. fluorescens, 3. Ps. species (nicht einzuordnende Kulturen). Er hält Ps. putida für eine nicht proteolytische Variante von Ps. fluorescens. Dagegen bildet JESSEN (24) bei der Charakterisierung von 859 Pseudomonas-Kulturen - darunter 354 Ps. aeruginosa-Kulturen - 82 Biotypen. Die "Reklassifizierung" des Genus Pseudomonas scheint ihm unumgänglich zu sein.

2.32 Die Charakterisierung der in Milch zu erwartenden
Pseudomonas-Arten

Ps. aeruginosa (Schröter) Migula 1894. Typspezies im Genus Pseudomonas.

In der älteren Literatur wird die Möglichkeit der Abgrenzung dieses Keimes von anderen Arten bezweifelt (BROWN (5)). Auch besteht keine einheitliche Auffassung über die Zahl der Geißeln. Während KLINGE (30) die polar monotriche Begeißelung als Speziesmerkmal ansieht und hinsichtlich der Geißelzahl mit GABY und HADLEY (14), PULVERER und KORTH (49), BEER (2) und STANIER und Mitarbeiter (59) übereinstimmt, beobachteten HAYNES (22), JESSEN (24) und LYSENKO (42) bis zu 3 Geißeln.

GABY (13) gibt für die Routinediagnose von Ps. aeruginosa folgende Merkmale an: Koloniemorphologie, Beweglichkeit, polare Begeißelung, Geruch, Gelatinespaltung, negative Ureasereaktion und Kahmhautbildung im flüssigen Nährmedium. Von diesen Eigenschaften hält KÖHLER (37) nur den Geruch für charakteristisch. Nach seiner Ansicht sind die Bildung von Hämolyisin und Pyocyanin, das Wachstum in der Lackmusmilch, die Mäusepathogenität und die serologische Prüfung von größerer Bedeutung. Die Identifizierung von apyocyanogenen Kulturen hält er für unmöglich. Zur Abgrenzung apyocyanogener Kulturen schlägt HAYNES (22) folgende 3 Reaktionen vor: Wachstum bei 42°C, Oxydation von Kaliumglukonat zu 2-Ketoglukonat und Schleimbildung in der Kaliumglukonatbouillon nach HAYNES (22). RHODES (52) lehnt den diagnostischen Wert des Glukonattestes ab, da von 169 nicht zur Spezies Ps. aeruginosa gehörenden Pseudomonaden 88 % auch eine positive Reaktion zeigten.

KÖHLER (38) schlägt zur Erkennung apyocyanogener Kulturen die Cytochromoxydasereaktion vor. KLINGE (30) weist jedoch darauf hin, daß Ps. fluorescens und Ps. putida auch eine positive Cytochromoxydasereaktion zeigen.

Er hält die monotriche Begeißelung, die Pyocyaninbildung, das Wachstum bei 42°C, die Gelatinespaltung und die schwach positive Eigelbreaktion für die wichtigsten Kriterien zur Erkennung von Ps. aeruginosa. JESSEN (24) dagegen bezweifelt den diagnostischen Wert der Pyocyaninbildung, da die Zahl der apyocyanogenen Stämme zu hoch sei. Er betrachtet die Nitratreduktion, die Gelatinespaltung und das Wachstum bei 42°C als die für eine Charakterisierung wichtigsten Eigenschaften mit der Einschränkung, daß der Wert der Prüfung auf Wachstum bei 42°C durch den gleichen Wachstumsbereich von Ps. stutzeri begrenzt ist.

KIELWEIN (26) prüfte 58 Ps. aeruginosa-Kulturen - davon 48 aus Rohmilch - auf ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften. Soweit es sich um apyocyanogene Kulturen handelt, stellt er die Diagnose beim Vorliegen folgender Eigenschaften: Hämolysebildung, positiver Cytochromoxydasetest, oxydativer Glukoseabbau, Wachstum bei 42°C, typisches Wachstum im Chinasäurenährboden nach KORTH, Alkalisierung, Gerinnung, Peptonisierung und Reduzierung von Leckmusmilch. Er kommt mit PULVERER und KORTH (49), KLEINMAIER und SCHUBERT (28) übereinstimmend zum Ergebnis, daß Ps. aeruginosa eine positive Eigelbreaktion gibt.

KIELWEIN (26) prüfte auch die Spaltung und Verwertung von niederen Alkoholen. Äthanol und Propanol wurde mit wenigen Ausnahmen gespalten und von allen Kulturen als einzige Kohlenstoffquelle verwertet. Bei Methanol und Butanol fielen die Ergebnisse unterschiedlich aus. Auch NIKODEMUSZ und JAVOR (46) konnten demonstrieren, daß Ps. aeruginosa aus Propanol und Isopropanol Säure bildet. SIMON (57) beschreibt die Säurebildung aus D-Arabinose als charakteristisch für Ps. aeruginosa. Während alle untersuchten 124 Pseudomonas-Kulturen aus L-Arabinose Säure bildeten, konnte die Spaltung von D-Arabinose nur durch Ps. aeruginosa demonstriert werden.

Über die Charakterisierung anderer milchhygienisch bedeutungsvoller *Pseudomonas*-Arten liegen nur wenige Arbeiten vor. Die Ergebnisse der entsprechenden Veröffentlichungen sind der besseren Übersicht wegen in den Tabellen 1, 1a, 2 und 2a zusammengefaßt.

Das Verhalten von *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. taetrolens* und *Ps. fragi* wird in der Oxydase- und Cytochromoxydasereaktion, in der Bildung von Katalase sowie hinsichtlich des Wachstums bei 22°C übereinstimmend beschrieben.

Ps. fluorescens wird im Wesentlichen charakterisiert durch die Gelatineverflüssigung, die Gerinnung, Alkalisierung, Peptonisierung und Reduzierung von Lackmusmilch, die positive Eigelbreaktion und Kaseolyse sowie durch das fehlende Wachstum bei 42°C. *BERGEY'S MANUAL* (4) gibt abweichend von den Angaben in Tabelle 1 die monotriche Begeißelung und keine Gerinnung von Lackmusmilch an.

Für die Erkennung von *Ps. putida* sind entsprechend den Angaben der Literatur von Bedeutung: Das Fehlen der Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung, die Alkalisierung der Lackmusmilch, die negative Eigelbreaktion und das Fehlen der Fähigkeit zur Kaseolyse. Nach den Angaben von *BERGEY'S MANUAL* (4) verändert *Ps. putida* die Lackmusmilch nicht.

Ps. taetrolens ist durch das Fehlen der Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung, durch die Gerinnung, Säuerung und Reduktion der Lackmusmilch, die negative Eigelbreaktion und Kaseolyse charakterisiert. *BERGEY'S MANUAL* (4) gibt die Säurebildung durch *Ps. taetrolens* aus Glukose, Laktose, Galaktose, Mannose, Fruktose, Rhamnose, Xylose, Glyzerin und Mannit an, während keine Säurebildung aus Äskulin, Dextrin, Dulcit, Glykogen, Inulin, Maltose, Raffinose, Salicin, Sorbit, Stärke, Saccharose, Arabinose und Trehalose verzeichnet ist.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Literaturangaben zur Charakterisierung von Pseudomonaden

		Ps. aeruginosa					Ps. fluorescens				Ps. putida			Ps. täti-rolens		Ps. fragi
		Klinge (30)	Lysenko (42)	Pulverer (49)	Jessen (24)	Kielwein (26)	Klinge (30)	Rhodes (52)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Klinge (30)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Lysenko (42)
Beweglichk.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Geißeln		1	v	1	1-3	-	>1	>1	>1	1	2-5	>1	1-3	1	1	1
Oxydase		-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Cytochromox		+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Katalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Pyocyanin		v	v	v	v	v	∅	-	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Fluorescein		v	+	+	v	+	v	-	+	+	+	+	-	∅	+	∅
Indol		∅	∅	-	∅	v	∅	∅	∅	-	∅	∅	-	∅	-	∅
Wachstum bei	5°C	-	∅	-	∅	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	22°C	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	37°C	+	+	+	+	+	∅	∅	v	v	∅	v	v	+	∅	v
	42°C	+	+	+	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Zeichenerklärung: + = positiv, ∅ = negativ, v = variabel,
- = keine Angabe

Tabelle 1a: Zusammenfassung der Literaturangaben zur
Charakterisierung von Pseudomonaden

		Ps. aeruginosa					Ps. fluorescens				Ps. putida			Ps. tāt-rolens		Ps. fragi
		Klinge (30)	Lysenko (42)	Pulverer (49)	Jessen (24)	Kielwein (26)	Klinge (30)	Rhodes (52)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Klinge (30)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Lysenko (42)	Jessen (24)	Lysenko (42)
H ₂ S		v	v	+	v	+	∅	v	v	∅	∅	v	∅	∅	∅	∅
Urease		∅	+	+	+	+	∅	v	v	v	∅	v	v	∅	+	∅
NO ₃ zu	NO ₂	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+	+	∅	+	∅	v
	N ₂	-	+	+	v	v	-	-	v	-	-	∅	∅	∅	-	∅
Gelatinesp.		+	+	+	+	+	+	v	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Lackmusmilch	G.P. R. P.R.A.		R.P. A.	A.R. P.G.	G.B. A.R.	P.P.A, (R)	P.A, (R)	A.R. P.			A.	A.	A.	P.R.S.G.	A.	
Eigelb-R.	(+)	-	+	∅	+	+	+	v	-	+	∅	-	∅	-	∅	-
Caseolyse	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	∅	-	+	-	∅
Stärkeolyse	+	+	+	+	+	-	+	v	+	v	(v)	(v)	∅	+	∅	+
Ämolyse	+	+	+	+	+	+	v	v	∅	v	∅	∅	v	∅	∅	∅
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ aus Pept.	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Zahl d. Kult.	15	33	65	354	58	27	134	9	44	6	8	93	-	4	-	

Bezeichnerklärung: + = positiv, ∅ = negativ, v = variabel, - = keine Angabe
() = schwache Reaktion, A = Alkalisierung, S = Säuerung,
G = Gerinnung, P = Peptonisierung, R = Reduktion

Tabelle 2: Die Spaltung von Kohlenhydraten und Alkoholen durch Pseudomonaden. Literaturauszug

	Ps. aeruginosa			Ps. fluorescens		Ps. putida		Ps. t.rolens	Ps. fragi
	Pulverer-Korth (49)	Jessen (24)	Kielwein (26)	Klinge (27)	Jessen (24)	Klinge (30)	Jessen (24)	Jessen (24)	Lýsenko (42)
Adonit	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø
Äskulin	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dextrin	Ø	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Dulcit	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Erythrit	Ø	Ø	Ø	-	+	-	Ø	Ø	-
Galaktose	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Glukose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glykogen	Ø	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Glyzerin	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+
Inosit	Ø	Ø	Ø	v	+	v	Ø	v	-
Inulin	+	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Laktose	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	(+)	-

Zeichenerklärung: + = positiv, Ø = negativ, v = variabel
 - = keine Angabe, () = schwache Reaktion

Tabelle 2a: Die Spaltung von Kohlenhydraten und Alkoholen durch Pseudomonaden. Literaturauszug

	Ps. aeruginosa			Ps. fluorescens		Ps. putida		Ps. t.rolens	Ps. fragi
	Pulverer-Korth (49)	Jessen (24)	Kielwein (26)	Klinge (27)	Jessen (24)	Klinge (30)	Jessen (24)	Jessen (24)	Lysenko (42)
Laevulose	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Maltose	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	-
Mannit	+	+	+	(+)	+	(+)	Ø	+	Ø
Mannose	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Raffinose	Ø	Ø	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	-
Rhamnose	Ø	Ø	Ø	v	(+)	v	Ø	+	-
Saccharose	Ø	Ø	Ø	v	+	v	Ø	Ø	-
Salicin	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	-
Sorbit	Ø	Ø	Ø	v	+	v	Ø	Ø	-
Sorbose	Ø	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Stärke	Ø	Ø	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	-
Trehalose	+	v	v	v	+	v	Ø	Ø	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Zeichenerklärung: + = positiv, Ø = negativ, v = variabel,
 - = keine Angabe, () = schwache Reaktion

Für die Identifizierung von Ps. fragi sollen das Fehlen der Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung und zur Kasedlyse und die Alkalisierung der Lackmusmilch entscheidend sein. Demgegenüber ist Ps. fragi in BERGEY'S MANUAL (4) durch die Gelatineverflüssigung, die Gerinnung und Säuerung der Lackmusmilch mit Bildung eines Fruchtaromas charakterisiert. Weiterhin ist die Bildung von Säure aus Glukose, Galaktose und Arabinose angegeben, während aus Glyzerin, Inulin, Laktose, Fruktose, Matlose, Mannit, Raffinose, Salicin und Saccharose keine Säurebildung beschrieben ist.

3.0 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.11 Herkunft der Kulturen

Für die Untersuchung standen 384 *Pseudomonas*-Kulturen zur Verfügung. Nach den Fundorten lassen sich die Kulturen entsprechend Tabelle 3 aufschlüsseln. Zur Vergleichsuntersuchung dienten folgende Referenzstämme des ARS Culture Collection Investigations Fermentation Laboratory, Peoria, Illinois: NRRL B-23 *Ps. aeruginosa*, NRRL B-13 *Ps. putida*, NRRL B-14 *Ps. taetrolens*, NRRL B-25 *Ps. fragi*, NRRL B-950 *Ps. putrefaciens* und NRRL B-2040 *Ps. synxantha*.^{*)}

Tabelle 3: Herkunft der untersuchten Kulturen

Herkunft		Anzahl
Natürlicher Fundort: Teichwasser		9
Mensch		4
Milchhygienisch bedeutungsvolle Fundorte	Brauchwasser	30
	Milch	292
	Melkgeräte	24
Stammsammlung		7
Tier	Kühe	11
	Bulle	1
	Schwein	1
Zusammen		384

*) Auch an dieser Stelle danke ich Herrn Prof.Dr. Blobel, Gießen, für die Überlassung der Referenzstämme.

Außerdem wurden 4 Ps. aeruginosa-Kulturen aus der Stammsammlung der Milchabteilung des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf verwendet, die ursprünglich von CASELITZ (Hamburg) aus Sektionsmaterial vom Menschen isoliert worden waren.

3.12 Nährböden

Folgende Nährmedien und Reagenzien fanden Anwendung:

- 3.121 Nähragar mit 1 % Fleischextrakt, 0,3 % Hefeextrakt und 0,1 % Glukose
- 3.122 Blutagar mit 8 % Rinderblut, 0,1 % Glukose und 50 IE. Penicillin-G-Natrium je ml.
- 3.123 Chinasäureagar nach KIELWEIN (26)
(Modifikation des flüssigen Chinasäurenährbodens nach KORTH (siehe 3.131))
- 3.124 Nährbouillon (mit 1 % Fleischextrakt ohne Glukose)
- 3.125 Nährboden zum Farbstoffnachweis nach PULVERER und KORTH (49)
- 3.126 Nährgelatine
- 3.127 Lackmusmilch
- 3.128 Eigelbagar nach KLINGE (29)
- 3.129 Kaseinagar nach FRAIZER und RUPP (12)
- 3.131 Chinasäurenährboden nach KORTH (35)
- 3.132 Simmon's Zitratmedium (Merck Art.Nr. 2501)⁺
- 3.133 0,15%ige Nitratbouillon mit 1 % Fleischextrakt
- 3.134 SIM-Nährmedium (Merck Art.Nr. 5470)
- 3.135 Nährboden für H₂S-Nachweis:
Fleischpepton (Witte)⁺⁺ 2,5 g, NaCl 0,5 g, Cystin 0,01 g, ad 100,0 g Aqua dest., pH 7,2. Der Nährboden wird zu 4,0 ml in Reagensgläser abgefüllt und 20 Minuten bei 110°C und 1,1 atü Druck autoklaviert.
- 3.136 Tweennährboden zum Lipasenachweis nach SIERRA (56)
Zusatz von Tween 20, 40, 60, 80 (Serva Art.Nr. 37470/72/74/75).

⁺) Merck Darmstadt, Katalog von 1966

⁺⁺) Serva-Entwicklungslabor Heidelberg, Katalog v. 1.2.1968

- 3.137 HUGH-LEIFSON-Medium (23) mit Zusatz folgender Zucker (1%ig) und Alkohole (2%ig): Adonit, Äskulin, L-Arabinose, Dextrin, Dulcitol, meso-Erythrit, D-Galaktose, D-Glukose, Glykogen, Glycerin, Inosit, Inulin, Laktose, D-Laevulose, Maltose, D-Mannit, D-Mannose, Raffinose, L-Rhamnose, D-Saccharose, Salicin, D-Sorbit, L-Sorbose, Stärke, Trehalose, D-Xylose, Methanol, Äthanol, Propanol und Butanol.
- Zur Prüfung auf Harnstoffspaltung wurden dem Medium 2 % Glukose und 0,5 % Harnstoff zugegeben (nach KIELWEIN (26)).
- 3.138 Nährmedium nach PULVERER und KORTH (49) mit Zusatz der unter 3.137 aufgeführten Zucker und Alkohole.
- 3.139 Oxydasereagens: 1%ige Dimethyl-p-phenylendiammoniumhydrochloridlösung (Merck)
- Cytochromoxydasereagens: Mischung einer 1%igen wässrigen N,N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumdichloridlösung (Merck) mit einer 1%igen alkoholischen Lösung von alpha-Naphtol (Serva) im Verhältnis 3:2 (CASELITZ (8)).
- 3.141 Katalasereagens nach RÖDER
- 3.142 Zur Resistenzbestimmung wurden Testplättchen⁺ verwendet, die mit folgenden Antibiotika getränkt waren: Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Polymixin B, Colistin, Nalidixinsäure und Rifamycin.

3.2. Methoden

- 3.21 Bestimmung der Anwachsrate auf Chinasäureagar (Vorversuch)
- Hierzu wurden 0,1 ml 24-stündiger Bouillonkulturen der unter 3.11 aufgeführten Pseudomonas-Arten in den Verdünnungen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} vergleichsweise auf Blutagar (3.122) und Chinasäureagar (3.123) ausgespielt. Nach 72-stündiger Bebrütung bei 25°C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt

⁺) Firma Mack, Illertissen

3.22 Technik der Isolierung von Pseudomonas-Kulturen

Für die Isolierung aus Rohmilch wurde das von KIELWEIN (26) vorgeschlagene Verfahren angewendet. Um eine Aussage über den prozentualen Anteil der vorkommenden Pseudomonaden an der Milchflora treffen zu können, wurden zunächst alle in 290 Milchproben gefundenen Pseudomonaden zur Charakterisierung herangezogen. Da jedoch in diesem Material Ps. fragi und Ps. taetrolens nur in geringer Zahl vorhanden war, wurden weitere 1686 Milchproben auf diese Pseudomonaden-Arten selektiv überprüft. Dazu wurden alle aus diesen Milchproben isolierten Pseudomonas-Kulturen auf Kaseolyse und Verhalten in Lackmusmilch geprüft. Kulturen, die Kasein spalteten und Lackmusmilch säuerten, wurden einer weiteren Charakterisierung unterzogen.

Die von Melkgeräten entnommenen Tupferproben wurden direkt auf Chinasäureagar (3.123) ausgestrichen. Für die Untersuchung von Brauchwasser auf Pseudomonaden wurden Proben aus Milcherzeugerbetrieben entnommen, deren Wasser bei früheren Untersuchungen einen hohen Keimgehalt aufwies. Es wurde jeweils 0,1 ml der Proben auf den Chinasäureagar (3.123) ausgespatelt.

3.23 Kulturmorphologie und Hämolysebildung:

Die Kulturen wurden auf in Petrischalen erstarrten Blutagar (3.122) und Nähragar (3.121) übertragen und nach 2-tägiger Bebrütung bei 25°C unter einem Präpariermikroskop, Beck Modell Kassel, bei Vergrößerung 1:20 beurteilt.

3.24 Zellmorphologie:

Ausstriche der Kulturen wurden nach Gram gefärbt. Zur Geißelfärbung wurden die Methoden nach LEIFSON (41) und SOLARI, HERRERO und PAINCERA (58) herangezogen (siehe Abbildung 1, 2, 3, 4, 5).

3.25 Beweglichkeitsprüfung:

Die Beweglichkeit wurde an 24-stündigen Bouillonkulturen im hängenden Tropfen geprüft.

3.26 Oxydase- und Cytochromoxydasereaktion:

Es wurde die Technik nach KOVACS (36) verwendet.

3.27 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen:

Die Wachstumsversuche wurden in Nährbouillon (3.124) im Wasserbad bei 5°C, 22°C, 37°C und 42°C durchgeführt. Die Stärke des Wachstums wurde auf Grund der Bakterien-dichte nach 1 bis 3 Tagen - bei der Bebrütungstemperatur von 5°C nach 7 Tagen - bestimmt.

3.28 Farbstoffnachweis:

Die Kulturen wurden im Nährmedium nach PULVERER und KORTH (3.125) für 5 Tage bei 25°C bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen unter einer UV-Lampe +) auf das Vorhandensein von Fluorescein überprüft.

Zur Untersuchung auf Pyocyanin wurden die Kulturen mit Chloroform ausgeschüttelt.

3.29 Prüfung der Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung:

Die stichförmig beimpfte, bei 25°C bebrütete Nährgelatine wurde am 1., 3., 8. und 14. Tag überprüft.

3.211 Wachstum in Lackmusmilch:

Die Beimpfung erfolgte vom festen Nährboden aus. Die bei 25°C bebrüteten Lackmusmilchkulturen wurden täglich bis zu 14 Tage auf Gerinnung, Peptonisierung, Reduktion und pH-Wert-Verschiebung geprüft.

3.212 Eigelbreaktion:

Die Kulturen wurden strichförmig auf dem Eigelbagar nach KLINGE (3.128) ausgestrichen. Nach 3-tägiger Bebrütung bei 25°C wurde eine deutliche Trübung um oder unter dem Impfstrich als positiv bewertet (siehe Abbildung 6).

*) Quarzlampengesellschaft m.b.H. Hanau, Art.Nr. 5261

3.213 Prüfung auf Kaseolyse:

In den in Petrischalen erstarrten Kaseinagar nach FRAIZER und RUPP (3.129) wurden Löcher mit einem Durchmesser von 0,5 cm ausgestanzt, in die jeweils 0,1 ml Milchkulturüberstand gegeben wurde. Nach 24-stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wurde geprüft, ob sich eine deutliche Klärungszone gebildet hatte (siehe Abbildung 7).

3.214 Wachstum im flüssigen Chinasäurenährmedium:

Das Nährmedium nach KORTH (3.131) wurde mit Material von festen Nährböden beimpft und für 5 Tage bei 25°C bebrütet. Das Wachstum der eingepimpften Kulturen wurde nach der Trübung des Mediums beurteilt. Außerdem wurde die Färbung der Kultur entsprechend dem Vorschlag von KORTH (35) beobachtet.

3.215 Wachstum auf Simmon's Zitratmedium:

Das Medium (3.132) wurde von festen Kulturen beimpft und nach 8-tägiger Bebrütung bei 25°C auf Wachstum und pH-Wert-Verschiebung beurteilt.

3.216 Nitratreduktion:

Das Medium (3.133) wurde von festen Kulturen beimpft und nach 8 - 10-stündiger Bebrütung bei 25°C mittels Nitritreagenz auf das Vorhandensein von Nitrit geprüft. Der Ammoniaknachweis wurde mittels Nessler Reagens geführt, während die Bildung von Stickstoff in Gärröhrchen nach 8-tägiger Bebrütung bei 25°C demonstriert wurde.

3.217 Ureasenachweis:

Die von KIELMEIN (26) beschriebene Methode im Hugh-Leifson-Medium (siehe 3.137) fand Anwendung. Bebrütet wurde für 20 Tage bei 25°C. Die Alkalisierung des Mediums wurde als positive Reaktion beurteilt.

3.219 Nachweis von Schwefelwasserstoff:

Der Nachweis wurde mittels Bleiacetatpapier im flüssigen Medium (3.135) bei 25°C geführt. Außerdem wurde auch das SIM-Medium auf H₂S-Bildung überprüft.

3.221 Prüfung auf Katalasebildung:

Eine Öse Koloniematerial wurde im Katalasereagens nach RÖDER verrieben. Als positive Reaktion wurde das Freiwerden von gasförmigem Sauerstoff gewertet.

Die quantitative Katalasebestimmung wurde in den Katalaseröhrchen nach RÖDER durchgeführt. Hierzu wurden die Röhrchen bis zur unteren Ringmarke mit 24-stündigen Bouillonkulturen, die 1:10 mit sterilem aqua dest. verdünnt worden waren, gefüllt. Bis zur mittleren Ringmarke wurde dann Katalasereagens nach RÖDER dazugegeben. Die Menge des freigebliebenen Sauerstoffes wurde nach 3 Stunden an der in die Röhrchen eingravierten Skala abgelesen.

3.222 Peroxydase-nachweis:

Die bei HALLMANN (21) beschriebene Methode wurde angewendet.

3.223 Prüfung auf Lipolyse:

Das Tweenmedium nach SIERRA (3.136) wurde strichförmig beimpft und 4 Tage bei 25°C bebrütet. Als positiv wurde die deutlich sichtbare Ausfällung von Fettsäuren um den Impfstrich gewertet (siehe Abbildung 8).

3.224 Prüfung auf Spaltung von Kohlenhydraten und Alkoholen:

Die zu prüfenden Kohlenhydrate und Alkohole wurden dem autoklavierten HUGH-LEIFSON-Medium (3.137) zugesetzt; dann wurde im Dampftopf für weitere 15 Minuten sterilisiert. Die Röhrchen, die niedere Alkohole enthielten, wurden während der Sterilisation im Dampftopf mit Gummistopfen fest verschlossen und mit Gewichten beschwert.

Nach einer 2-tägigen Sterilitätskontrolle bei 25°C wurden die Nährmedien mit Material von festen Nährböden stich-

förmig beimpft. Die Kulturen wurden am 1., 3. und 8. Tag nach der Beimpfung auf Wachstum und Säurebildung überprüft.

3.225 Prüfung auf Verwertung von Kohlenhydraten und Alkoholen als einzige Kohlenstoffquelle:

Die Untersuchungen wurden im Medium nach PULVERER und KORTH (3.138) durchgeführt. Zusatz der Zucker und Alkohole, Sterilisierung und Beimpfung erfolgten wie unter 3.224 angegeben. Nach 8-tägiger Bebrütung bei 25°C wurden die Ergebnisse der Prüfungen nach dem Grad der Trübung des Mediums beurteilt. Als positiv wurde nur eine deutliche Trübung beurteilt, während eine schwache Trübung als zweifelhaft - (+) - gewertet wurde.

3.226 Resistenz gegenüber Antibiotika:

Die Resistenzprüfung erfolgte im Plättchentest auf Blutagar. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 25°C wurde das Ergebnis wie folgt beurteilt:

+ = Hemmhof von mehr als 2 mm

Ø = Hemmhof unter 2 mm oder kein Hemmhof.

4.0

ERGEBNISSE

4.1 Vorversuch

4.11 Allgemeines

In dem Vorversuch sollte durch Bestimmung der Anwachsrate geprüft werden, in wie weit der Chinasäureagar (3.123) zur Isolierung von Pseudomonaden geeignet ist.

4.12 Ergebnis

Alle 7 Vergleichskulturen zeigten ein gutes Wachstum auf Chinasäureagar. Die Anwachsrate auf Blutagar und Chinasäureagar sind in der Tabelle 4 vergleichend dargestellt. Aus dem Ergebnis des Vorversuchs kann geschlossen werden, daß der Chinasäureagar zur Anzüchtung der in Milch zu erwartenden Pseudomonaden geeignet ist.

Tabelle 4: Die Anwachsrate von Pseudomonaden auf Chinasäureagar im Vergleich zu Blutagar

		Ps. aerugi- nosa	Ps. fluores- cens	Ps. puti- da	Ps. taetro- lens	Ps. fragi	Ps. putrefa- ciens	Ps. synxan- tha
Zahl d. Kol. auf	Blut- agar	77	14	25	26	23	48	28
	Chinasäure- agar	70	15	18	24	32	48	35

4.2 Hauptversuch

4.21 Vorkommen von Pseudomonaden in Rohmilch, Brauchwasser und Melkgeräten

Bei der Überprüfung von 1976 Lieferantenproben wurden in 1322 (66,9 %) Proben Pseudomonaden gefunden. Durchschnittlich konnten 7685 Pseudomonas-Keime je ml Milch ermittelt werden. Als höchste Keimzahl wurden 300 000/ml in 3 Proben gefunden. Die Tabelle 5 zeigt, in welcher Anzahl die Keime aus den 194 Pseudomonaden enthaltenden repräsentativen Milchproben isoliert werden konnten. 96 (33,11 %) Proben enthielten weniger als 100 oder keine Pseudomonaden. In 5 (1,37 %) Proben bestand die Milchflora fast ausschließlich aus Pseudomonaden.

Tabelle 5: Die Häufigkeitsverteilung der Keimzahl von Pseudomonaden in Rohmilch

Keimzahl	0 - 10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁶	Total
Proben insgesamt	96 33,1%	66 22,7%	112 38,8%	13 4,4%	3 1,0%	Ø Ø	290 100%

Aus allen 29 Tupferprobenausstrichen von Melkgeräten wuchsen Pseudomonaden in dichten Rasen.

Ebenso konnten aus allen 29 geprüften Brauchwasserproben Pseudomonaden isoliert werden. Die Tabelle 6 zeigt, in welcher Anzahl Pseudomonaden aus den Brauchwasserproben isoliert werden konnten. Im Mittel wurden 68 koloniebildende Einheiten je ml Brauchwasser gefunden. Etwa die Hälfte (51,9 %) der Proben enthielten weniger als 10 Pseudomonas-Keime je ml.

Tabelle 6: Die Häufigkeitsverteilung der Keimzahl von Pseudomonaden in 29 Brauchwasserproben

Keimzahl	1 - 10	10 - 10 ²	10 ² - 10 ³	> 10 ³
insgesamt	51,9%	30,9%	11,6%	5,6%

4.22 Charakterisierung der Vergleichsstämme

Alle 11 Vergleichsstämme zeigen auf einem 8%igen Blut-agar und Nähragar nach 2-tägiger Bebrütung bei 25°C gutes Wachstum. Alle Stämme waren gramnegativ.

Die Kolonie- und Zellform läßt sich wie folgt beschreiben:

Ps. aeruginosa: Großflächige (4 - 5 mm Ø), graue Kolonie mit gelapptem Rand. Kurze, gerade, gelegentlich gekrümmte, polar-monotrich begeißelte Stäbchen.

Ps. fluorescens: Erhabene, rötlich schimmernde Kolonie (2 - 3 mm Ø) mit glattem Rand. Längliche, gerade oder leicht gebogene, lophotrich (1 - 3) begeißelte Stäbchen.

Ps. putida: Kugelige, grau-weiße Kolonie (3 - 4 mm Ø) mit glattem Rand. Kurze, gerade, lophotrich (1 - 6) begeißelte Stäbchen.

Ps. taetrolens: Grau-weiße, erhabene Kolonie (2 - 3 mm Ø) mit gelblichem Zentrum. Längliche, gerade, lophotrich (1 - 3) begeißelte Stäbchen mit Kettenbildung.

Ps. fragi: Kugelige, glänzende Kolonie (3 - 4 mm Ø) mit durchscheinendem Rand. Gerade, längliche, monotrich begeißelte Stäbchen.

Ps. putrefaciens: Grau-grüne, leicht erhabene, glänzende Kolonie (2 - 3 mm Ø). Längliche, heteromorphe, lophotrich (1 - 4) begeißelte Stäbchen.

Ps. synxantha: Graue, leicht kugelige Kolonie (2 - 3 mm ϕ) mit glattem Rand. Längliche, gerade, lophotrich (1 - 3) begeißelte Stäbchen.

Die weiteren Charakterisierungsmerkmale der Vergleichskulturen sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wurden bei der Prüfung auf Hämolysebildung, Gelatineverflüssigung, Verhalten in der Lackmuspilch, Wachstum bei 42°C, Eigelbreaktion und Kaseolyse unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Bei der Prüfung auf Säurebildung und Verwertung als einzige Kohlenstoffquelle wurde bei folgenden Zuckern und Alkoholen unterschiedliches Verhalten beobachtet: Adonit, Arabinose, Erythrit, Galaktose, Inosit, Laktose, Maltose, Mannit, Rhamnose, Saccharose, Sorbit, Trehalose, Methanol und Propanol.

4.23 Zusammenfassende Darstellung der Charakterisierungsergebnisse

Alle 373 Kulturen zeigten auf Blut- und Nähragar bei 25°C innerhalb 48 Stunden ein gutes Wachstum. 305 Kulturen bildeten S-Form, 39 Kulturen R-Form, 5 Kulturen SR-Form, 18 Kulturen M-Form und 3 Kulturen SM-Form. Alle 373 Kulturen bestanden aus gramnegativen Stäbchen. Mit Ausnahme von 2 unbeweglichen Kulturen waren alle polar begeißelt. Die Zahl der Geißeln schwankte zwischen 1 - 6. Alle Kulturen bauten Glukose oxydativ ab und zeigten gutes Wachstum bei 22°C. Auf Simmon's Zitratmedium und im Chinasäurenährboden nach Korth wuchsen sie ebenfalls gut. Sie bildeten Katalase, jedoch kein Indol; aus Pepton wird Ammoniak abgespalten.

Aus Arabinose, Glukose, Glyzerin und Xylose wurde von allen Kulturen Säure gebildet, während aus Dextrin, Glykogen, Inulin, Raffinose, Sorbose und Stärke keine Kultur Säure bildete. Als einzige Kohlenstoffquelle wurde von allen Kulturen verwendet: Galaktose, Glukose, Glyzerin, Laevulose, Mannose und Xylose. Keine der Kulturen konnte Dextrin, Glykogen und Stärke verwerten.

Reaktion	P _{s.} aeruginosa	P _{s.} fluorescens	P _{s.} putida	P _{s.} taetrolens	P _{s.} fragi	P _{s.} putrefac.	P _{s.} syntantha	Zucker und Alkohole	P _{s.} aeruginosa	P _{s.} fluorescens	P _{s.} putida	P _{s.} taetrolens	P _{s.} fragi	P _{s.} putrefac.	P _{s.} syntantha
Beweglichk.	+	+	+	+	+	+	+	Adonit	0	+	0	0	0	0	0
Geißeln	1	-3	-6	-3	1	-4	-3	Askulin	0	0	0	0	0	0	0
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Cytochromox.	+	+	+	+	+	+	+	Dextrin	0	0	0	0	0	0	0
Katalase	+120	+10	+5	+5	+10	+15	0	Dulcit	0	0	0	0	0	0	0
Peroxydase	+	+	+	+	+	+	+	Erythrit	0	0	+	0	0	0	0
Pyocyanin	+	0	0	0	0	0	0	Galaktose	+	+	+	+	+	+	(+)
Fluorescein	+	0	+	+	0	0	+	Glukose	+	+	+	+	+	+	+
5 Grad C	+	+	+	+	+	+	+	Glykogen	0	0	0	0	0	0	0
22Grad C	+	+	+	+	+	+	+	Glyzerin	+	+	+	+	+	+	+
37Grad C	+	0	+	0	+	0	0	Inosit	0	0	+	0	0	0	0
42Grad C	+	0	0	0	0	0	0	Inulin	0	0	0	0	0	0	0
ChinasKorth	+	+	+	+	+	+	+	Laktose	0	0	0	0	+	0	0
NH ₃ aus Pept.	+	+	+	+	+	+	+	Laevulose	+	+	+	+	+	+	+
Indol	0	0	0	0	0	0	0	Maltose	0	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	+	0	0	0	0	0	0	Mannit	+	+	0	0	0	0	0
Urease	+	+	+	+	+	+	+	Mannose	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ zu NO ₂	+	0	0	0	0	0	0	Raffinose	0	0	0	0	0	0	0
NO ₃ zu N ₂	+	0	0	0	0	0	0	Rhamnose	0	0	+	0	+	0	0
Gelatinesp.	+	+	0	0	+	0	0	Saccharose	0	0	0	0	0	+	0
Lackmusmilch	g.g.a.p.r.	a.g.g.p.r.	a.g.g.p.r.	a.g.g.p.r.	a.g.g.p.r.	a.g.g.p.r.	a.g.g.p.r.	Salicin	0	0	0	0	0	0	0
Eigelb	+	+	0	0	+	0	0	Sorbit	0	+	0	0	0	0	0
Kaseolyse	+	+	0	0	0	0	0	Sorbose	0	0	0	0	0	0	0
Lipolyse	+	+	+	+	+	+	+	Stärke	0	0	0	0	0	0	0
Hämolyse	+	0	0	0	0	0	0	Trehalose	0	0	+	0	0	+	0
Zitrat	+	+	+	+	+	+	+	Xylose	+	+	(+)	+	+	+	(+)
Kolonieform	S	S	S	S	S	S	S	Methanol	+	0	+	+	+	+	0
g=geronnen, a=alkalisiert								Äthanol	+	+	+	+	+	+	+
p=peptonisiert, r=reduziert								Propanol	+	0	+	+	+	+	0
Spaltung/Wachstum, ()=schwache Reaktion, + = positiv, 0 = negativ								Butanol	+	0	0	+	0	+	0

Die Ergebnisse der Prüfungen mit unterschiedlichem Ausfall sind in den Tabellen 8 und 8a zusammengefaßt. Nur 5 der untersuchten 373 Pseudomonas-Kulturen zeigten eine negative Oxydase- und Cytochromoxydasereaktion. Abgesehen von einer Kultur waren alle Kulturen nicht befähigt zur Säurebildung und Deckung ihres Kohlenstoffbedarfes aus Äskulin, Dulcitol und Salicin. Aus Galaktose, Laevulose, Mannose und Propanol wurde jeweils nur von einer Kultur keine Säure gebildet.

Tabelle 8: Ergebnisse der Prüfungen mit unterschiedlichem Ausfall bei 373 Ps.-Kulturen

R e a k t i o n		+	Ø	R e a k t i o n		+	Ø
Oxydase		368	5	H ₂ S		98	275
Cytochromoxyd.		368	5	Urease		331	42
Peroxydase		368	5	NO ₃	NO ₂	94	279
Hämolyse		81	292	zu	N ₂	85	288
Pyocyanin		25	348	Gelatinesp.		210	163
Fluorescein		323	50	Lackmusmilch		GPAR=202, AR=137 SGR=33, AGR= 1	
Wachs- tum bei	5°C	334	39	Eigelb		211	162
	37°C	106	267	Kaseolyse		202	171
	42°C	40	333	Lipolyse		306	67

G = Gerinnung, A = Alkalisierung

P = Peptonisierung, R = Reduktion

+ = positiv, Ø = negativ

	S p a l t u n g		W a c h s t u m		
	+	Ø	+	(+)	Ø
Adonit	148	225	144	2	227
Askulin	1	372	1	-	372
Arabinose	373	-	304	19	50
Dulcitol	1	372	1	-	372
Erythrit	141	232	146	-	227
Galaktose	372	1	368	5	-
Inositol	162	211	165	2	206
Inulin	-	373	-	26	347
Laktose	34	339	1	-	372
Laevulose	372	1	373	-	-
Maltose	107	266	241	30	102
Mannit	217	156	217	1	155
Mannose	372	1	373	-	-
Raffinose	-	373	-	11	362
Rhamnose	192	181	53	7	313
Saccharose	116	257	127	-	246
Salicin	1	372	-	1	372
Sorbit	98	275	109	16	248
Trehalose	196	177	200	-	173
Methanol	363	10	39	21	313
Ethanol	371	2	300	17	56
Propanol	372	1	73	32	268
Butanol	298	75	27	25	321

Tabelle 8a: Spaltung und Verwertung von Zuckern und Alkoholen im Hugh-Leifson Nährboden: Zusammenstellung nicht einheitlicher Ergebnisse

+ = positiv, Ø = negativ, (+) = schwache Reaktion

4.24 Versuch einer Gruppierung der charakterisierten Pseudomonaden

Bei dem Versuch, die charakterisierten Pseudomonas-Kulturen in Gruppen einzureihen, werden nicht die bei allen Kulturen gleich gefundenen Eigenschaften (siehe 4.231), sondern nur die folgenden, bei der Prüfung der Kulturen nicht einheitlich ausgefallenen Eigenschaften berücksichtigt. Es waren dies: Kultur- und Zellmorphologie, Oxydase- und Cytochromoxydasereaktion, Bildung von Pyocyanin und Fluorescein, Wachstum bei 5°C, 37°C und 42°C, Bildung von Schwefelwasserstoff und Urease, Nitratreduktion, Gelatineverflüssigung, Wachstum in Lackmusmilch, Eigelbreaktion, Kaseolyse, Lipolyse und Hämolyse. Nicht einheitlich waren weiterhin die Ergebnisse der Prüfungen auf Säurebildung und/oder auf die Fähigkeit zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs aus folgenden Zuckern und Alkoholen: Adonit, Äskulin, Arabinose, Dulcitol, Erythrit, Galaktose, Inosit, Inulin, Laktose, Laevulose, Maltose, Mannit, Mannose, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, Salicin, Sorbit, Trehalose, Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol.

4.241 Gruppe I - Ps. aeruginosa

Entsprechend den Angaben im Schrifttum (2.32) und den Charakterisierungsmerkmalen der Vergleichskultur (Tabelle 7) ist Ps. aeruginosa durch folgende wesentliche Merkmale charakterisiert: Wachstum bei 42°C, Spaltung von Gelatine, Alkalisierung, Gerinnung, Peptonisierung und Reduzierung von Lackmusmilch und Hämolysinbildung.

40 Kulturen ließen sich entsprechend dieser Beschreibung einordnen. Morphologisch konnten 3 Kolonieförmigkeiten unterschieden werden:

1. Grün-braune, flache Kolonien mit unregelmäßig gelapptem Rand (4 - 5 mm Ø). S-Form, 22 Kulturen.

2. Metallisch glänzende, runde, flache Kolonien mit glattem Rand (3 - 4 mm Ø). S-Form, 9 Kulturen.
3. Kugelige, feinkörnig granulierte Kolonien mit glattem Rand (2 - 3 mm Ø). R-Form, 9 Kulturen.

Alle 40 Kulturen verhielten sich in folgenden Eigenschaften einheitlich: Sie zeigten eine polar monotriche Begeißelung und waren stark beweglich; nur bei 4 Kulturen wurden insgesamt 7 Zellen mit 2 polaren Geißeln und bei einer Kultur 1 Zelle mit 3 polaren Geißeln beobachtet. Sie gaben eine positive Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion, bildeten Fluorescein, wuchsen gut bei 37 und 42°C, bildeten auf Nährbouillon eine Kahmhaut, zeigten eine positive Urease-reaktion, reduzierten Nitrat zu Nitrit und Stickstoff, spalteten Gelatine, verursachten Gerinnung, Peptonisation, Alkalisierung und Reduktion der Lackmusmilch, bauten Eigelb, Kasein und Tweenpräparate ab und lösten Hämolyse auf Rinderblutagar aus. Die Prüfung auf Säurebildung aus Zuckern und Alkoholen ergab für alle Kulturen einheitlich positive Resultate bei Methanol, Äthanol und Propanol und einheitlich negative Ergebnisse bei Adonit, Äskulin, Dulcit, Erythrit, Inosit, Laktose, Maltose, Mhamnose, Saccharose, Salicin und Sorbit. Als einzige Kohlenstoffquelle konnten alle Kulturen Mannit und Äthanol verwerten. Adonit, Äskulin, Dulcit, Erythrit, Inosit, Inulin, Laktose, Maltose, Saccharose und Salicin konnte von keiner Kultur als einzige Kohlenstoffquelle verwendet werden. Unterschiedliches Verhalten ergab sich bei den in Tabelle 9 aufgeführten Reaktionen.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, bildeten mehr als die Hälfte (15) der Kulturen kein Pyocyanin, und nur eine Kultur zeigte Wachstum bei 5°C.

Nur eine Kultur bildete keine Säure aus Galaktose und Mannose, und je eine Kultur aus Laevulose bzw. Mannit.

4.242 Gruppe II - Ps. fluorescens

Wie aus dem Schrifttum (2.32) und dem Ergebnis der Charakterisierung einer Vergleichskultur (Tabelle 7) hervorgeht, ist Ps. fluorescens durch die folgenden wesentlichen Eigen-

Tabelle 9: Ergebnisse der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall bei 40 *Ps.aeruginosa*-Kulturen

Reaktion	+	Ø	Reaktion	+	Ø
H ₂ S	35	5	Wachstum bei 5°C	1	39
Pyocyanin	25	15			
Zucker und Alkohole	S p a l t u n g		W a c h s t u m		
	+	Ø	+	(+)	Ø
Arabinose	40	-	10	3	17
Galaktose	39	1	40	-	-
Laevulose	39	1	40	-	-
Mannit	39	1	39	1	-
Mannose	39	1	40	-	-
Raffinose	-	40	-	2	38
Rhamnose	-	40	-	3	37
Sorbit	-	40	4	9	27
Trehalose	22	18	25	-	15
Methanol	40	-	8	8	24
Propanol	40	-	16	4	20
Butanol	(33)	7	5	2	33

+ = positiv, Ø = negativ, (+) = schwache Reaktion

schaften gekennzeichnet: Kein Wachstum bei 42°C, Spaltung von Gelatine, Gerinnung, Peptonisierung, Alkalisierung und Reduktion von Leckmuskmilch, positive Eigelbreaktion sowie Kaseolyse.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien konnten 146 Kulturen in diese Gruppe eingereiht werden. 41 Kulturen zeigten auf

Reaktion	+	Ø	Reaktion		+	Ø
Fluorescein	135	11	NO ₃ zu	NO ₂	39	107
37 Grad C	6	140		N ₂	37	109
H ₂ S	44	102	Hämolyse		41	105
Urease	138	8	Kolonieform		S=136,R=10	
Zucker und	Spaltung		Wachstum			
Alkohole	+	Ø	+	(+)	Ø	
Adonit	142	4	143	1	2	
Arabinose	146	-	131	-	15	
Erythrit	141	5	142	1	3	
Inosit	144	2	145	1	-	
Maltose	66	80	102	14	30	
Raffinose	-	146	23	9	114	
Rhamnose	145	1	50	3	93	
Saccharose	90	56	97	-	49	
Sorbit	97	49	102	5	39	
Trehalose	143	3	143	-	3	
Methanol	141	5	16	6	124	
Athanol	144	2	99	13	34	
Propanol	145	1	8	15	123	
Butanol	97	49	5	9	132	

Tabelle 10: Ergebnisse der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall bei 146 Ps. fluorescens-Kulturen

+ = positiv, Ø = negativ, (+) = schwache Reaktion

auf Rinderblutagar Hämolyse. Auf Blutagar wuchsen die nicht hämolysierenden Kulturen in Kolonien mit einer charakteristischen rot-violetten Farbe. Bis auf eine unbegeißelte waren alle 146 Kulturen lophotrich (1 -6) begeißelt und stark beweglich.

Alle 146 Kulturen zeigten folgendes einheitliches Verhalten: Positive Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion, keine Pyocyaninbildung, gutes Wachstum bei 5°C, kein Wachstum bei 42°C, Gelatinespaltung, Gerinnung, Peptonisierung, Alkalisierung und schwache Reduktion von Lackmusmilch, positive Eigelbreaktion, Kaseolyse sowie Lipolyse. Säure wurde von allen 146 Kulturen aus Adonit, Galaktose, Laevulose, Mannit und Mannose, keine Säure dagegen aus Äskulin, Dulcit, Laktose und Salicin gebildet. Die Verwertung von Inosit und Mannit als einzige Kohlenstoffquelle war allen Ps. fluorescens-Kulturen, die von Äskulin, Dulcit, Inulin, Laktose und Salicin keiner Kultur möglich. Die Ergebnisse der Prüfungen mit unterschiedlichem Ausfall sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich ist, bildeten von 146 Ps. fluorescens-Kulturen 135 Fluorescein. Nur 6 Kulturen zeigten Wachstum bei 37°C. Fast alle Kulturen bildeten Säure aus folgenden Zuckern: Adonit (142), Erythrit (141), Inosit (144), Rhamnose (145) und Trehalose (143). Als einzige Kohlenstoffquelle wurde Adonit von 144, Erythrit und Trehalose von 143 Kulturen verwertet.

4.243 Gruppe III - Ps. putida

Ps. putida ist nach den Angaben des Schrifttums (2.32) und dem Ergebnis der Prüfung einer Vergleichskultur (Tabelle 7) durch folgende Eigenschaften charakterisiert: Kein Wachstum bei 42°C, keine Gelatinespaltung, nur Alkalisierung von Lackmusmilch, negative Eigelbreaktion und Unvermögen zur Kaseinspaltung. Dieser Beschreibung entsprachen 137 Kulturen. Hinsichtlich der Kulturmorphologie bestand keine Einheitlichkeit. Während 15 Kulturen in glasig-gelben Kolonien mit erhabenem Zentrum und durchscheinendem Randstreifen wuchsen, bildeten 37 Kulturen grau-weiße, konzent-

risch geschichtete Kolonien mit Randstreifen und erhabenem Zentrum. Die restlichen Kulturen wuchsen in hell-weißen, lockeren Kolonien mit erhabenem Zentrum und breitem, durchscheinendem Rand.

In folgenden Eigenschaften waren alle 137 Kulturen einheitlich: Bis auf eine unbegeißelte waren alle Kulturen stark beweglich und lophotrich (1 - 6) begeißelt; sie bildeten kein Pyocyanin, wuchsen gut bei 5°C, jedoch nicht bei 42°C. Gelatine wurde nicht gespalten, Lackmusmilch wurde alkalisiert und nach 4 - 5 Bebrütungstagen langsam von unten reduziert. Die Eigelbreaktion war negativ. Die Kulturen waren weder zur Kaseolyse noch zur Hämolyse befähigt.

Aus Galaktose, Laevulose, Mannose, Äthanol und Propanol wurde Säure und aus Äskulin, Dulcit, Erythrit, Laktose und Salicin keine Säure gebildet. Äskulin, Dulcit, Erythrit, Inulin, Laktose, Raffinose und Salicin konnten nicht als einzige Kohlenstoffquelle verwendet werden.

Die Ergebnisse der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gaben 5 Kulturen (die alle zu den 15 Kulturen, die sich durch die glasig-gelben Kolonien von den übrigen Ps. putida-Kulturen unterscheiden, gehören) eine negative Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion.

folgende Zucker wurden von nahezu allen 137 Ps. putida-Kulturen weder gespalten noch als einzige Kohlenstoffquelle verwendet: Adonit und Inosit (136), Mannit (129), Saccharose (130) und Trehalose (131). Sorbit wurde von einer Kultur gespalten und von 3 Kulturen als alleinige Kohlenstoffquelle verwertet.

Tabelle 11: Ergebnisse der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall bei 137 Ps.putida-Kulturen

Reaktion	+	∅	Reaktion		+	∅
Oxydase	132	5	NO ₃ zu	NO ₂	14	123
Cytochromoxyd.	132	5		N ₂	2	135
Peroxydase	132	5	Urease		121	16
Fluorescein	117	20	Lipolyse		75	62
37 Grad C	58	79	H ₂ S		14	123
Kolonieformen: S=123, R=8, SR=2, SM=3, M=1						
Zucker und Alkohole	S p a l t u n g		W a c h s t u m			
	+	∅	+	(+)	∅	
Adonit	1	136	1	-	136	
Arabinose	137	-	106	13	18	
Inosit	1	136	1	-	136	
Maltose	7	130	99	11	27	
Mannit	8	129	8	-	129	
Rhamnose	12	125	2	1	134	
Saccharose	7	130	7	-	130	
Sorbit	1	136	2	1	134	
Trehalose	6	131	6	-	131	
Methanol	132	5	8	5	124	
Athanol	137	-	123	2	12	
Propanol	137	-	36	6	95	
Butanol	124	13	10	11	116	

+ = positiv, ∅ = negativ, (+) =schwache Reaktion

4.244 Gruppe IV - Ps. taetrolens

Entsprechend den Angaben der Literatur (2.32) und dem Ergebnis der Prüfungen einer Vergleichskultur (Tabelle 7) ist Ps. taetrolens charakterisiert durch fehlende Gelatinespaltung, Säuerung, Gerinnung und schwache Reduktion von Lackmusmilch, kein Wachstum bei 42°C, negative Eigelb-reaktion und keine Kaseolyse.

In diese Gruppe konnten 25 Kulturen eingeordnet werden.

Morphologisch waren die Kulturen durch grau-weiße, flache, runde Kolonien mit an rohe Kartoffeln erinnerndem Geruch gekennzeichnet.

Einheitliches Verhalten wurde in folgenden Eigenschaften beobachtet: Positive Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion, keine Pyocyandinbildung, Wachstum bei 5°C, kein Wachstum bei 37 und 42°C, keine Nitratreduktion, keine Gelatineverflüssigung, Gerinnung, Säuerung und Reduktion von Lackmusmilch, keine Kaseolyse und keine Bildung von Hämolyisin.

Säure wurde von allen 25 Kulturen aus Galaktose, Laktose, Laevulose, Maltose, Mannose, Methanol, Äthanol und Butanol gebildet, während aus Adonit, Äskulin, Dulcit, Erythrit, Salicin und Sorbit keine Säure gebildet wurde. Arabinose, Maltose und Äthanol konnten als einzige Kohlenstoffquelle verwertet werden. Eine Verwertung von Äskulin, Dulcit, Erythrit, Inulin, Raffinose, Rhamnose, Salicin und Sorbit als einzige Kohlenstoffquelle fand nicht statt.

Die Ergebnisse der Prüfungen mit unterschiedlichem Ausfall sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Wie die Ergebnisse zeigen, war nur eine Kultur befähigt, Eigelb abzubauen, und nur 2 Kulturen bildeten Schwefelwasserstoff. Laktose wurde von einer Kultur als einzige Kohlenstoffquelle verwendet.

Tabelle 12: Ergebnis der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall bei 25 Ps.taetrolens-Kulturen

Reaktion	+	Ø	Reaktion	+	Ø
Fluorescein	15	10	Urease	21	4
H ₂ S	2	23	Bigelb	1	24
Lipolyse	21	4	Kolonieform: S=10, R=12, SR=2, M=1		
Zucker und	S p a l t u n g		W a c h s t u m		
Alkohole	+	Ø	+	(+)	Ø
Inosit	13	12	13	-	12
Laktose	25	-	1	-	24
Mannit	7	18	7	-	18
Saccharose	8	17	8	-	17
Trehalose	7	18	7	-	18
Methanol	25	-	5	1	19
Propanol	25	-	5	3	17
Butanol	25	-	1	1	23

+ = positiv, Ø = negativ, (+) = schwache Reaktion

4.245 Gruppe V - Ps. fragi

Nach den Angaben des Schrifttums (2.32) und der Charakterisierung der Referenzkultur (Tabelle 7) ist Ps. fragi durch die folgenden wesentlichen Eigenschaften gekennzeichnet:

Kein Wachstum bei 42°C, Verflüssigung von Gelatine;
 Lackmuspilch wird gesäuert, reduziert und zur Gerinnung gebracht, wobei sich an der Oberfläche ein rötlicher Ring ausbildet und die Kulturen einen Geruch nach Erdbeeren an-

nehmen. Die Eigelbreaktion ist positiv, Kasein wird nicht gespalten.

Von den charakterisierten Kulturen ließen sich 8 in diese Gruppen einordnen. Alle 8 Kulturen wuchsen in kugelförmigen Kolonien mit durchscheinendem Rand; sie waren beweglich und monotrich begeißelt.

Alle 8 Kulturen ergaben eine positive Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion; sie bildeten kein Pyocyanin und kein Fluorescein. Bei 5°C wuchsen sie gut, während sie bei 37°C - mit 2 Ausnahmen - und bei 42°C kein Wachstum zeigten. Schwefelwasserstoff wurde nicht gebildet, Harnstoff wurde gespalten, Nitrat wurde nicht reduziert, Gelatine wurde gespalten, Lackmismilch wurde zur Gerinnung gebracht, gesäuert und von oben beginnend reduziert. Die Kulturen zeigten eine positive Eigelbreaktion, sie spalteten Tween, jedoch kein Kasein und bildeten kein Hämolysin.

Während alle Kulturen zur Säurebildung und zur Deckung ihres Kohlenstoffbedarfs aus Galaktose, Laktose, Laevulose, Maltose, Mannose, Rhamnose, Saccharose, Trehalose und Äthanol befähigt waren, war das bei Adonit, Äskulin, Dulcitol, Erythrit, Inosit, Inulin, Mannit, Raffinose, Salicin, Sorbit nicht der Fall.

Die Säurebildung aus Methanol, Propanol und Butanol war einheitlich, während die Prüfung auf Verwertung dieser Alkohole als einzige Kohlenstoffquelle unterschiedliche Ergebnisse zeigte.

4.246 Gruppe VI - Ps. species

Eine Gruppe einheitlicher Pseudomonaden konnte unter keine der beschriebenen Arten eingereiht werden.

Die Gruppe umfaßte 16 Kulturen, die runde oder unregelmäßige, flache mit einem deutlichen, wallartigen Rand umgrenzte schleimige Kolonien bildeten, die einen Geruch nach KCN zeigten. Die Kulturen waren stark beweglich und zeigten eine lophotriche (1-6) Begeißelung.

Alle Kulturen ergaben eine positive Oxydase-, Cytochromoxydase- und Peroxydasereaktion, sie bildeten kein Pyocyanin jedoch Fluorescein, sie wuchsen gut bei 5°C, während sie bei 37°C und 42°C kein Wachstum zeigten, sie spalteten keinen Harnstoff, verflüssigten Gelatine, verursachten Gerinnung, Peptonisierung, Alkalisierung, und Reduzierung der Lackmusmilch, waren befähigt, Eigelb, Kasein und Tween abzubauen, bildeten jedoch kein Hämolyisin.

Säure wurde von allen 16 Kulturen aus Galaktose, Laevulose, Mannit, Mannose, Methanol, Äthanol und Propanol gebildet, während aus Adonit, Äskulin, Dulcit, Erythrit, Laktose, Maltose und Salicin keine Säure gebildet wurde. Arabinose und Mannit konnte als einzige Kohlenstoffquelle verwertet werden; eine Verwertung von Adonit, Äskulin, Dulcit, Inulin, Laktose, Raffinose, Rhamnose, Salicin und Methanol als einzige Kohlenstoffquelle fand nicht statt.

Die Ergebnisse der Prüfungen mit unterschiedlichem Ausfall sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Wie aus dieser Tabelle zu entnehmen ist, konnte die H₂S-Bildung nur bei 2, die Nitratreduktion nur bei einer Kultur nachgewiesen werden.

Der Nachweis der Säurebildung aus Inosit konnte nur bei 3, aus Rhamnose bei einer, aus Saccharose bei 2 und aus Sorbit bei einer Kultur geführt werden. Sorbit wurde nur von einer Kultur als einzige Kohlenstoffquelle verwendet.

Tabelle 13: Ergebnis der Prüfungen mit nicht einheitlichem Ausfall bei 16 Ps.species-Kulturen

R e a k t i o n	+	Ø	R e a k t i o n	+	Ø
H ₂ S	2	14	NO ₃ zu NO ₂	1	15
Zucker und	Spaltung		Wachstum		
Alkohole	+	Ø	+	(+)	Ø
Erythrit	-	16	3	-	13
Inosit	3	13	5	1	10
Maltose	-	16	7	4	5
Rhamnose	1	15	-	-	16
Saccharose	2	14	2	-	14
Sorbit	1	15	1	-	15
Trehalose	9	7	10	-	6
Äthanol	16	-	4	2	10
Propanol	16	-	2	2	12
Butanol	10	6	2	1	13

+ = positiv, Ø = negativ, (+) = schwache Reaktion

4.247 Nachtrag

Eine Kultur, die hinsichtlich der wesentlichen Eigenschaften von allen anderen Kulturen und den Angaben der Literatur erheblich abweicht, wird getrennt aufgeführt. Diese Kultur kann durch folgende Eigenschaften charakterisiert werden:

Sie zeigt kein Wachstum bei 42°C, sie verflüssigt keine Gelatine, in Lackmusmilch ruft sie Gerinnung, Alkalisierung

und Reduktion hervor, Unvermögen zur Eigelbspaltung, zur Kaseolyse, zur Lipolyse und zur Hämolyse.

Aus Äskulin, Dulcitol, Laktose und Salicin wurde Säure gebildet. Die gleichen Kohlenhydrate wurden auch als einzige Kohlenstoffquelle ausgewertet.

4.248 Quantitative Katalasebestimmung

Bei der quantitativen Katalasebestimmung wurden unterschiedliche Werte von 0 bis 120 ermittelt. Über die Verteilung der Katalasewerte gibt die Tabelle 14 Aufschluß.

Katalasezahl	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. putida	Ps. taetrolens	Ps. fragi	Ps. sp. Gr.VI.
>120	100	-	-	-	-	-
100 - 110	-	-	-	-	-	-
90-100	-	-	-	-	-	-
80-90	-	3,44	5,91	-	-	-
70-80	-	5,48	1,43	-	-	-
60-70	-	8,21	1,43	-	-	-
50-60	-	6,18	2,28	8	-	-
40-50	-	13,36	2,95	4	-	-
30-40	-	19,34	8,02	12	-	-
20-30	-	22,52	13,08	16	-	12,26
10-20	-	15,29	20,4	28	37,5	18,84
0-10	-	6,18	44,5	32	62,5	68,9
Zahl d.Kult.	40	146	137	25	8	16

Tabelle 14: Die prozentuale Verteilung der Werte bei der quantitativen Katalasebestimmung

Im Mittel wurden für die einzelnen Gruppen folgende Katalasewerte erhoben:

Gr. I - <u>Ps. aeruginosa</u> :	einheitlich über 120
Gr. II - <u>Ps. fluorescens</u> :	32,4
Gr. III - <u>Ps. putida</u> :	29,1
Gr. IV - <u>Ps. taetrolens</u> :	17,2
Gr. V - <u>Ps. fragi</u> :	6,8
Gr. VI - <u>Ps. species</u> :	7,0

Ps. aeruginosa unterscheidet sich von den restlichen Gruppen dadurch, daß alle Werte über 120 liegen.

249 Resistenz gegenüber Antibiotika

Die Ergebnisse der Prüfung auf Resistenz gegenüber Antibiotika sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Die überprüften *Pseudomonas*-Kulturen zeigen eine hohe Resistenz gegenüber Rifamycin (90,6 %), Chloramphenicol (61,0 %), Colistin (59,8 %) und Nalidixinsäure (47 %).

Eine geringe Resistenz bestand gegenüber Tetracyclin (7,5 %), Kanamycin und Neomycin (0,5 %).

Gegenüber Gentamycin waren alle Kulturen empfindlich.

251 Die Häufigkeit der Pseudomonas-Arten in Rohmilch

Die eingruppierten 373 Kulturen können entsprechend ihrer Herkunft wie in Tabelle 16 dargestellt aufgeschlüsselt werden. Die aus 290 repräsentativen Rohmilchproben (siehe 3.22) isolierten und charakterisierten 194 *Pseudomonas*-Kulturen verteilen sich auf die einzelnen Arten wie folgt:

Spezies	Zahl der Kulturen	%	Häufigkeit in % der Proben
Ps.fluorescens	105	54,15	35,86
Ps.putida	53	27,30	18,61
Ps.aeruginosa	20	10,32	6,89
Ps.sp.-Gr.VI	10	5,15	3,44
Ps.taetrolens	3	1,54	1,03
Ps.fragi	2	1,03	0,68
Ps.sp.nicht eingeord.	1	0,51	0,34

Tabelle 15: Das Antibiogramm von *Pseudomonaden*

	Strepto- mycin	Tetra- cyclin	Chloram- phenicol	Kana- mycin	Genta- mycin	Neo- mycin	Poly- myxinB	Colis- tin	Nalidix- säure	Rifa- mycin
	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅	+ ∅
Ps. aeruginosa (15)	9 6	12 3	6 9	14 1	15 -	15 -	15 -	13 2	1 14	- 15
Ps. fluorescens (91)	49 42	87 4	30 61	90 1	91 -	90 1	35 56	22 69	38 53	7 84
Ps. putida (28)	23 5	27 1	14 14	28 -	28 -	26 2	17 11	12 16	6 22	
Ps. taetrolens (15)	15 -	15 -	3 12	15 -	15 -	15 -	6 9	10 5	- 15	
Ps. fragi (8)	8 -	4 4	8 -	8 -	8 -	5 3	1 7	6 2	- 8	
Ps. species (15)	12 3	14 1	6 9	15 -	15 -	15 -	10 5	14 1	1 14	
resistent in %	32,5	7,5	61,0	1,1	0	0,5	35,4	59,8	47,0	90,6

∅ = resistent, + = empfindlich

Tabelle 16: Die Herkunft der charakterisierten Pseudomonas-Arten

Spezies	Anzahl der Kulturen	Herkunft der Arten			
		Milch	Wasser	Melkgeräte	Tier
Ps.aeruginosa	40	20	2	5	13
Ps.fluorescens	146	104	28	14	-
Ps.putida	137	125	7	5	-
Ps.taetrolens	25	24	-	1	-
Ps. fragi	8	8	-	-	-
Ps.sp. Gr.VI.	16	10	2	4	-
Ps.sp. ⁺	1	1	-	-	-
Gesamtzahl	373	292	39	29	13

⁺ = nicht eingeordnet

In der Regel wurde aus einer Milchprobe nur eine Art isoliert. Aus 20 Proben wurden jeweils 2 Pseudomonas-Arten isoliert, und zwar aus 10 Ps. fluorescens und Ps. putida, aus 4 Ps. fluorescens und Ps. aeruginosa, aus einer Ps. fluorescens und Ps. taetrolens, aus 4 Ps. putida und Ps. aeruginosa sowie aus einer Ps. aeruginosa und Ps. spezies, Gruppe VI. Auffallend ist, daß von 20 Ps. aeruginosa-Kulturen 9 in Gesellschaft mit anderen Pseudomonas-Arten angetroffen wurden.

5.0 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Der Nachweis von Pseudomonaden in 1322 (66,9 %) von 1976 überprüften Rohmilchproben steht in Übereinstimmung mit den Angaben von KIELWEIN (25) und BEYTHIEN (3), die bei ihren Untersuchungen aus 68,4 % beziehungsweise 61,8 % der von ihnen überprüften Rohmilchproben Pseudomonaden isolieren konnten.

Die Feststellung von Pseudomonaden in allen untersuchten Brauchwasserproben ist verständlich, weil die Proben aus Milcherzeugerbetrieben stammten, deren Wasser bereits bei früheren Untersuchungen eine hohe Zahl an Pseudomonaden aufwies.

Der Nachweis von Pseudomonaden mittels Tupferproben von allen verunreinigten Melkgeräten bestätigt ebenfalls die Angaben von KIELWEIN (25), der aus 84 % der von ihm überprüften Melkgeräte Keime der Gattung *Pseudomonas* isolieren konnte.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Vergleichsstämme zeigen, daß die Mehrzahl ihrer Eigenschaften mit den in der Literatur angegebenen übereinstimmen.

Bemerkenswert sind folgende, gegenüber den Berichten in der Literatur abweichende Eigenschaften der Referenzstämme: Im Gegensatz zu den Angaben in BERGEY'S MANUAL (4) verflüssigten die Referenzkulturen *Ps. putrefaciens* und *Ps. synxantha* keine Gelatine; *Ps. putrefaciens* reduzierte nur verzögert und schwach Lackmusmilch und *Ps. synxantha* alkalisierte lediglich die Lackmusmilch, ohne sie zur Gerinnung oder zur Reduktion zu bringen.

In Übereinstimmung mit BERGEY'S MANUAL (4) verursachte *Ps. fragi* eine Säuerung und Gerinnung von Lackmusmilch, während LYSENKO (42) bei diesem Keim eine Alkalisierung beobachtete. Die fehlende Fluoresceinbildung der Referenzkultur von *Ps. fluorescens* bestätigte die Ansicht von KLINGE (30), der diese Eigenschaft für nicht konstant hält.

Tabelle 17a: Vergleich der Eigenschaften eigener Kulturen mit den Literaturangaben

Reaktion	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. putida	Ps. taetrolens	Ps. fragi	Ps. spezies
Beweglichkeit	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -
Geißeln	1-3 (1-3)	1-6 (1)	1-6 (1)	1-4 (1)	1 (1)	1-5 -
Oxydase	+100 (+)	+100 (+)	+ 97 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -
Cytochromoxydase	+100 (+)	+100 (+)	+ 97 (+)	+100 -	+100 -	+100 -
Katalase	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -
Peroxydase	+100 (+)	+100 -	+100 -	+100 -	+100 -	+100 -
Pyocyanin	Ø 62 (v)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
Fluorescein	+100 (+v)	+ 93 (v+)	+ 87 (+)	+ 60 (+Ø)	Ø 100 (Ø)	+100 -
5 Grad C	Ø 98 (Ø)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -
22 Grad C	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -
37 Grad C	+100 (+)	Ø 96 (vØ)	Ø 60 (vØ)	Ø 100 (Ø+)	Ø 75 (v)	Ø 100 -
42 Grad C	+100 (+)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
Citrat	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -

+ = positiv, Ø = negativ, - = keine Angabe, () = Literaturangaben
Die Zahlen geben die Häufigkeit in % an.

Tabelle 17b: Vergleich der Eigenschaften eigener Kulturen mit den Literaturangaben

Reaktion	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. putida	Ps. taetrolens	Ps. fragi	Ps. spezies
Indol	Ø100 (Øv)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 -
H ₂ S	Ø 88 (v+)	Ø 83 (vØ)	Ø 90 (Øv)	Ø 92 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 88 -
Urease	+100 (+Ø)	+ 93 (vØ)	+ 89 (vØ)	+ 84 (+Ø)	+100 (Ø)	+100 -
NO ₃ zu NO ₂	+100 (+)	Ø 74 (v+)	Ø 90 (Ø+)	Ø100 (Ø+)	Ø100 (Øv)	Ø 94 -
NO ₃ zu N ₂	+100 (v+)	Ø 72 (v)	Ø 99 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 -
Gelatinesptng.	+100 (+)	+100 (v+)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	+100 (+Ø)	+100 -
Lackmuskmilch	G.P. A.R. (G.P. A.R.)	G.A. P.R. (G.A. P.R.)	A. (R). (A)	S.G.R. (S.G.A.)	S.G.R. (S.G.A.)	G.A.P. (R). -
Eigelb	+100 (+Ø)	+100 (v+)	Ø100 (Ø)	Ø 96 (Ø)	+100 -	+100 -
Gaseolyse	+100 (+)	+100 (+)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	+100 -
Lipolyse	+100 (+)	+100 (v+)	+ 55 (vØ)	+ 84 (+Ø)	+100 (+)	+100 -
Hämolysse	+100 (+)	Ø 72 (v)	Ø100 (Øv)	Ø100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø100 -
Chinas.-Korfh	+100 (+)	+100 (+)	+100 -	+100 -	+100 -	+100 -
NH ₃ aus Pepton	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+100 -

+ = positiv, Ø = negativ, - = keine Angabe, () = Literaturangaben
 Die Zahlen geben die Häufigkeit in % an.

elle 17c: Vergleich der Charakterisierungsergebnisse bei der Spaltung von Zuckern und Alkoholen mit den Literaturangaben

	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. putida	Ps. taetrolens	Ps. fragi
onit	Ø100 (Ø)	+ 98 (+Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
kulin	Ø 100 (Ø)	Ø100 -	Ø 100 -	Ø 100 -	Ø 100 -
abinose	+ 100 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 -
xtrin	Ø 100 (Ø)	Ø100 -	Ø 100 -	Ø 100 -	Ø 100 -
lcit	Ø 100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
ythrit	Ø 100 (Ø)	+ 97 (+)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
laktose	+ 98 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 -	+ 100 (+)
ukose	+ 100 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (+)
ykogen	Ø 100 (Ø)	Ø100 -	Ø 100 -	Ø 100 -	Ø 100 -
yzerin	+ 100 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (Ø)
osit	Ø 100 (Ø)	+ 99 (v+)	Ø 100 (Øv)	+ 52 (v)	Ø 100 -
ulin	Ø 100 (Ø+)	Ø100 -	Ø 100 -	Ø 100 -	Ø 100 -
ktose	Ø 100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	+ 100 (+)	+ 100 -
evulose	+ 98 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 -	+ 100 -
ltose	Ø 100 (Ø)	Ø 55 (Ø)	Ø 95 (Ø)	+ 100 (+)	+ 100 -
nnit	+ 98 (+)	+100 (+)	Ø 95 (Ø+)	Ø 72 (+)	Ø 100 Ø
nnose	+ 98 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 -
ffinose	Ø 100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
amnose	Ø 100 (Ø)	+100 (+v)	Ø 92 (vØ)	+ 100 (+)	+ 100 -
ccharose	Ø 100 (Ø)	+ 62 (v+)	Ø 95 (vØ)	Ø 68 (Ø)	+ 100 -
licin	Ø 100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
rbit	Ø 100 (Ø)	+ 67 (v+)	Ø 100 (Øv)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
rbose	Ø 100 (Ø)	Ø100 -	Ø 100 -	Ø 100 -	Ø 100 -
ärke	Ø 100 (Ø)	Ø100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 (Ø)	Ø 100 -
ehalose	+ 55 (v+)	+ 98 (v+)	Ø 96 (vØ)	Ø 72 (Ø)	+ 100 -
lose	+100 (+)	+100 (+)	+100 (+)	+ 100 (+)	+ 100 -

= Säurebildung, Ø = keine Säurebildung, () = Literaturangaben

= keine Angabe

Tabelle 18: Das prozentuale Verhältnis der nicht einheitlich ausgefallenen Reaktionen in der Spaltung und Verwertung von Zuckern und Alkoholen bei Pseudomonaden.

	Ps.aeruginosa		Ps.fluorescens		Ps.putida		Ps.taetrolens		Ps.fragil		Ps.sp.Gr.VI.	
	Sp.	W.	Sp.	W.	Sp.	W.	Sp.	W.	Sp.	W.	Sp.	W.
Adonit	Ø 100	Ø 100	+ 98	+ 99	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100
Erythrit	Ø 100	Ø 100	+ 97	+ 98	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100
Inosit	Ø 100	Ø 100	+ 99	+ 100	Ø 100	Ø 100	+ 52	+ 52	Ø 100	Ø 100	Ø 82	Ø 63
Laktose	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100	+ 100	Ø 96	+ 100	Ø 100	Ø 100	Ø 100
Maltose	Ø 100	Ø 100	Ø 55	+ 80	Ø 95	+ 82	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	Ø 100	+ 68
Mannit	+ 98	+ 100	+ 100	+ 100	Ø 95	Ø 95	Ø 72	Ø 72	Ø 100	Ø 100	+ 100	+ 100
Rhamnose	Ø 100	Ø 93	+ 100	Ø 64	Ø 92	Ø 98	+ 100	Ø 100	+ 100	Ø 100	Ø 94	Ø 100
Saccharose	Ø 100	Ø 100	+ 62	+ 67	Ø 95	Ø 95	Ø 68	Ø 68	+ 100	+ 100	Ø 88	Ø 88
Sorbit	Ø 100	Ø 68	+ 67	+ 74	Ø 100	Ø 98	Ø 100	Ø 100	Ø 100	Ø 88	Ø 94	Ø 94
Trehalose	+ 55	+ 63	+ 98	+ 98	Ø 96	Ø 98	Ø 72	Ø 72	+ 100	+ 100	+ 57	+ 63
Zahl d.Kult.	40		146		137		25		8		16	

Sp. = Spaltung, W. = Wachstum, Angaben in %-en.

Die Charakterisierungsergebnisse von 373 im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Pseudomonas*-Kulturen stehen ebenfalls im wesentlichen in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur. In den Tabellen 17 a, 17 b und 17 c sind die eigenen Untersuchungsergebnisse mit den im Schrifttum angegebenen Charakterisierungsmerkmalen verglichen.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, sind folgende Abweichungen von den Angaben in der Literatur bemerkenswert:

LYSENKO (42) beschreibt für Ps. taetrolens die monotriche Begeißelung, während bei den vorliegenden Untersuchungen in Übereinstimmung mit *BERGEY'S MANUAL* (4) 1 - 4 polar angeordnete Geißeln beobachtet wurden.

In Übereinstimmung mit den Angaben von *BERGEY'S MANUAL* (4) wurde bei Ps. fragi Gelatineverflüssigung sowie Säuerung, und Gerinnung von Lackmusmilch beobachtet. LYSENKO (42) dagegen spricht der Ps. fragi die Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung ab. Auch ist er der Ansicht, daß Ps. fragi lediglich eine Alkalisierung der Lackmusmilch auslöst. Die Prüfung auf Harnstoffspaltung fiel bei LYSENKO (42) ebenfalls negativ aus, während bei den vorliegenden Untersuchungen alle 8 Ps. fragi-Kulturen Urease bildeten. Die Ursache für diese Abweichungen könnten durch die verschiedene Untersuchungsmethodik bedingt sein. LYSENKO (42) verwendete bei seinen Untersuchungen Peptonbouillon, während bei den vorliegenden Untersuchungen das Hugh-Leifson-Medium zur Anwendung kam.

Für die Differenzierung von *Pseudomonaden* sind nur einige wenige Eigenschaften geeignet. Als wesentlich zur Differenzierung der in Milch nachgewiesenen *Pseudomonaden* wurden folgende Merkmale erkannt:

Wachstum bei 42°C, Gelatineverflüssigung, Verhalten in Lackmusmilch, Kaseolyse, Hämolyisinbildung, Katalasebildung (quantitativ) und der Geruch der Kulturen.

Zur Sicherung der Diagnose sind als ergänzende Reaktionen die Prüfung auf Bildung von Pyocyanin und Fluorescein sowie das Verhalten der Kulturen im Hugh-Leifson-Medium mit Zusatz von Adonit, Erythrit, Inosit und Rhamnose von Bedeutung.

Von den 373 charakterisierten Kulturen konnten auf Grund der oben genannten wesentlichen Merkmale alle Kulturen bis auf 17 in die folgenden Arten eingereiht werden:

Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. putida, Ps. taetrolens und Ps. fragi. Kulturen, die die Eigenschaften von Ps. putrefaciens und Ps. synxantha zeigen, waren nicht zu isolieren.

Von den 17 Kulturen, die sich nicht den oben beschriebenen Arten zuordnen ließen, zeichneten sich 16 durch einheitliches Verhalten aus. Sie wuchsen auf festen Nährböden in schleimigen Kolonien mit wallartigem Rand, die einen deutlichen Geruch nach KCN aufwiesen. Alle 16 Kulturen bildeten keine Säure aus Adonit und Erythrit, 13 Kulturen auch nicht aus Inosit und 15 nicht aus Rhamnose. In den übrigen Eigenschaften stimmen die Kulturen weitgehend mit Ps. fluorescens überein.

Aus der Tabelle 18 ist ersichtlich, daß auch ein unterschiedliches Verhalten - wenn auch nicht einheitlich - in der Säurebildung aus Saccharose und Sorbit bestand. Weder in BERGEY'S MANUAL (4) noch bei KRASSILNIKOV (39) ist eine Art beschrieben, deren Eigenschaften mit denen dieser Kulturen übereinstimmen. Insbesondere wurde für keine Art der Geruch nach KCN beschrieben, der bei allen Kulturen so deutlich ist, daß er einem aufmerksamen Untersucher nicht entgehen kann. Ob die von KLINGE (30) erwähnten schleimigen Kulturen, die er zu Ps. fluorescens rechnet, mit dieser Gruppe identisch sind, kann nicht geklärt werden, da er die Charakterisierungsergebnisse für diese schleimigen Kulturen nicht gesondert aufführt. Die bei der vorliegenden Untersuchung charakterisierten schleimigen Kulturen können auf Grund ihrer Kolonief orm und ihres Verhaltens gegenüber Adonit, Erythrit, Inosit und Rhamnose nicht als der Spezies Ps. fluorescens zugehörig betrachtet werden.

Bei den unter Ps. putida eingereihten Kulturen wurden 3 unterschiedliche Kolonief ormen beobachtet. Eine Gruppe unterschied sich deutlich von den beiden anderen durch ihre glasig-gelb pigmentierten Kolonien. Von den 15 Kulturen dieser Gruppe waren 5 in der Cytochromoxydaserreaktion negativ. Da jedoch

die biochemischen Eigenschaften dieser Kulturen sich nicht von denen von Ps. putida unterschieden, sind diese Kulturen trotz ihrer besonderen Kulturmorphologie unter Ps. putida aufgeführt. Allerdings bleibt abzuwarten, ob weitergehende Untersuchungen die Eingruppierung dieser Keime in die Spezies Ps. putida rechtfertigen.

Eine Kultur, die abweichend von allen übrigen Kulturen zur Spaltung von Äskulin, Dukt und Salicin befähigt war und die diese Kohlenhydrate außerdem als einzige Kohlenstoffquelle verwendete, konnte nicht eingeordnet werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß in Milch mit dem Vorkommen von mindestens 5 definierten *Pseudomonas*-Arten zu rechnen ist. Allerdings ist bei den vorliegenden Untersuchungen zu berücksichtigen, daß alle Kulturen auf Chinasäureagar selektiv angezüchtet wurden und daß durchaus die Möglichkeit besteht, daß auf diesem Medium nicht alle *Pseudomonaden* gleich gut anwachsen.

Den Meinungen von KLINGE (29) und BEER (2), die nur Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens und Ps. putida unterscheiden, kann nicht zugestimmt werden. Der Ansicht von GYLLENBERG und EKLUND (20), daß aus Milch Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. putrefaciens und Ps. fragi isoliert werden können, ist zuzustimmen mit der Einschränkung, daß bei der vorliegenden Untersuchung Ps. putrefaciens nicht, dagegen zusätzlich Ps. taetrolens nachzuweisen war.

Eine Differenzierung der in Milch vorkommenden *Pseudomonaden* ist zur Ermittlung von Kontaminationsquellen notwendig. Auch bei der Beurteilung einer erfolgten Kontamination von Milch und Milchprodukten mit *Pseudomonaden* wird man vielfach auf eine Differenzierung der isolierten *Pseudomonaden* nicht verzichten können, da die Fermentaktivität der *Pseudomonaden* unterschiedlich ausgeprägt ist.

Für die Differenzierung von in Milch zu erwartenden *Pseudomonaden* wird auf Grund der vorliegenden Untersuchungen folgender Bestimmungsschlüssel vorgeschlagen:

Allgemeine Eigenschaften der Pseudomonaden:

Gramnegative, polar begeißelte Stäbchen, obligat aerob, in der Regel stark beweglich. Cytochromoxydase positiv, oxydative Glukosespaltung, gelegentlich jedoch keine oder verzögerte Säurebildung aus Glukose.

1. Wachstum auf Blutagar

- a. mit Hämolyse 2
- b. ohne Hämolyse 3

2. Bebrütung in Nährbouillon (Wasserbad) bei 42°C

- a. Wachstum Ps.aeruginosa
- b. kein Wachstum Ps.fluorescens

3. Spaltung von Gelatine (2 Wochen bei 25°C)

- a. Spaltung 4
- b. keine Spaltung 6

4. Wachstum auf Kaseinagar

- a. Kaseolyse 5
- b. keine Kaseolyse 7

5. Wachstum auf Nähragar

- a. schleimige Kolonien mit Wallbildung Ps.species
Geruch der Kultur nach KCN (Gruppe VI)
- b. Kolonie anders als bei 5 a) Ps.fluorescens

6. Verhalten in Lackmusmilch

- a. Nur Alkalisierung und geringgradige Reduktion von unten Ps.putida
- b. Säuerung mit verzögerter Gerinnung sowie Reduktion Ps.taetrolens

7. Verhalten in Lackmusmilch

- a. Säuerung mit verzögerter Gerinnung und schwacher rosa Ringbildung an der Oberfläche, Fruchtgeruch Ps.fragi
- b. Alkalisierung, Gerinnung und Peptonisierung Ps.fluorescens

Weitere Kriterien zur Sicherung der Diagnose:

I. Ps. aeruginosa

1. Pyrocyaninbildung (kann möglich sein)
2. Bei quantitativer Katalasebestimmung Wert über 120

II. Ps. fluorescens

1. Fluoresceinbildung (kann fehlen)
2. In der Regel Säurebildung aus Adonit, Erythrit, Inosit und Rhamnose

III. Ps. species (Gruppe VI)

1. Keine Säurebildung aus Adonit, Erythrit und in der Regel auch nicht aus Inosit und Rhamnose.

Die bei der vorliegenden Untersuchung erstmals für die Differenzierung von Pseudomonaden eingesetzte quantitative Katalasebestimmung wird als neue und schnell durchzuführende Methode für die routinemäßige Erfassung von Ps. aeruginosa vorgeschlagen.

Ps. fluorescens stellt mit 54,1 % den Hauptanteil der in Rohmilch anzutreffenden Pseudomonaden. Ps. putida folgt mit 27,3 %, während Ps. aeruginosa mit 10,3 %, Ps. taetrolens mit 1,5 % und Ps. fragi mit 1,03 % an der Pseudomonadenflora der Milch beteiligt sind.

6.0

ZUSAMMENFASSUNG

1976 Rohmilchproben, 29 Brauchwasserproben und 29 Melkgeräte (Tupferproben) wurden auf eine Kontamination mit *Pseudomonaden* untersucht. In 66,9 % der Milchproben, aus allen Brauchwasserproben und aus allen Melkgeräten konnten *Pseudomonaden* isoliert werden.

Bei 373 *Pseudomonas*-Kulturen wurden 87 Eigenschaften untersucht. Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit den Charakterisierungsmerkmalen von Referenzkulturen und den Angaben in der Literatur konnten mit Ausnahme von 17 alle Kulturen in folgende Gruppen eingereiht werden: *Ps. aeruginosa* 40 (10,7 %), *Ps. fluorescens* 146 (39,1 %), *Ps. putida* 137 (36,7 %), *Ps. taetrolens* 25 (6,8 %) und *Ps. fragi* 8 (2,1 %). 16 (4,1 %) Kulturen verhielten sich in ihren kulturellen und biochemischen Eigenschaften einheitlich abweichend und wurden zu einer besonderen Gruppe - *Ps. species* - zusammengefaßt. Eine Kultur konnte nicht eingeordnet werden.

Zur Differenzierung von in Milch zu erwartenden *Pseudomonaden* wird ein Bestimmungsschlüssel vorgeschlagen.

7.0

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Baier, W.,
Leidl, W.,
Mahrla, A. u.
Schrödl, M.: Über das Pyocyaneum-Problem in
der künstlichen Besamung.
Berl. u. Münch. Tierärztl. Wschr. 68,
141 u. 157 (1955)
2. Beer, H.: Zur Diagnostik gramnegativer aerober
Stäbchen..
Path. et Microbiol. 26, 607 (1963)
3. Beythien, V.: Untersuchungen über den Einfluß der
Brauchwasserversorgung auf die hygieni-
sche Beschaffenheit der Milch.
Vet.Diss. Gießen in Vorbereitung
4. Breed, R.S.,
Murray, E.G.D. u.
Smith, N.R.: Bergey's Manual of determinative bacterio-
logy. 7th edition.
The Williams & Wilkins Company, Balti-
more (1957)
5. Brown, A.D.: Some general properties of a psychro-
philic pseudomonad.
J.gen.Microbiol. 17, 140 (1957)
6. Bruzynska, H.: Das Auftreten von Pseudomonasstäbchen
in Fleischprodukten.
zit.nach Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 119, 317 (1965)
7. Caselitz, F.H.: Zur Frage von Ps. aeruginosa und ver-
wandten Mikroorganismen als Enteritis-
erreger.
Zschr.Tropenmed. 9, 269 (1958)
8. Caselitz, F.H.: Pseudomonas-Aeromonas und ihre human-
medizinische Bedeutung.
Gustav Fischer Verlag, Jena 1966
9. De Ley, J.: Pseudomonas and related genera.
Ann. rev. Microbiol. 18, 17 (1964)
10. Deufel, J.: Zur Ökologie einiger Pseudomonas-Arten
im Bodensee-Obersee.
Zschr.Fischerei Hilfswiss. (NF) 6, 635 (1958)
11. Forrai, A. u.
Szazados, I. Sepsissel szövődött, Pseudomonas aeruginosa
okozta mastitis szarvasmarhákban.
M.A.L. 23 (XC) évf. 3, 153 (1968)
12. Frazier, H. u.
Rupp, L.: zit. in Demeter, K.: Bakteriologische Unter-
suchungsmethoden der Milchwirtschaft.
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1967)
13. Gaby, W.L.: Taxonomic problems relating to the identi-
fication of species within the genus
Pseudomonas,
Internat.Bull.Bact.Nomencl.Tax. 5, 153 (1955)

14. Gaby, W.L. u.
Hadley, L.: Practical laboratory test for the
identification of *Ps.aeruginosa*.
J.Bact. 74, 356 (1957)
15. Goerttler, V.: Die Bedeutung der Feststellung von
Bact. pyocyaneum im Präputium und
im Sperma bei Besamungstullen.
Mh.Vet.Med. 9, 9 (1954)
16. Götze, R.: Paarungs- und Besamungsinfektionen
beim Rind.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 57, 377 (1950)
17. Grün, L.: *Ps.pyocyanea* im Krankenhaus.
Goldschmidt informiert 1 Nr. 2 (1968)
18. Grün, L.: Herkunft und Wirkung von *Ps.pyocyanea*
in der Milch.
Milchwissenschaft 24, 14 (1969)
19. Gunsalus, R.,
Salisbury, S.u.
Willet, M.: The bacteriology of bull semen.
J.Dairy Sci. 24, 911 (1947)
20. Gyllenberg, H.G. u.
Eklund, E.: A taxonomic survey of the psychrophilic
bacteria in milk and milkproducts.
Milchwissenschaft 21, 261 (1966)
21. Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1955)
22. Haynes, W.C. u.
Rhodes, L.J.: Comparativ taxonomy of crytallogenic
strains of *Ps. aeruginosa* and *Ps.*
chlororaphis.
J.Bact. 84, 1080 (1962)
23. Hugh, R. u.
Leifson, E.: The taxonomic of fermentative versus
oxidative metabolism of carbohydrates
by various gramnegativ bacteria.
J.Bact. 66, 24 (1953)
24. Jessen, O.: *Pseudomonas aeruginosa* and other green
fluorescent *pseudomonas*.
Diss. Copenhagen (1965)
25. Kielwein, G.: Feststellung und Bewertung von *Pseudomonas*
in Milch.
Arch.f.Lebensmittelhyg. 19, 25 (1968)
26. Kielwein, G.,
Gerlach, R. u.
Johné, H.: *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchungen
über das Vorkommen in Rohmilch und die
bakteriologische Charakterisierung.
Arch.f.Lebensmittelhyg. 19, 145 (1968)
27. Kielwein, G. u.
Stehle, E.: persönliche Mitteilung (1969)

28. Kleinmaier, H. u. Schubert, R.H.W.: Zur Differentialdiagnose von *Pseudomonas aeruginosa*. Arch.Hyg.Bact. 145, 108 (1961)
29. Klinge, K.: Differenzierung der im Wasser vorkommenden Arten des Genus *Pseudomonas* durch die Eigelreaktion. Arch.Hyg. 141, 348 (1957)
30. Klinge, K.: *Ps.fluorescens*, ein Boden- und Wasserkeim. Physiologie und Identifizierung. Arch.Mikrobiol. 33, 1 (1959)
31. Klinge, K.: Differential techniques and methods of isolation of pseudomonads. J.Bact. 23, 442 (1960)
32. Knorr, M., Haas, F. u. Knorr, B.: Beobachtungen über das Versagen der biologischen Sperre bei der Entkeimung des versinkenden Wassers. Arch.Hyg. 140, 130 (1956)
33. Koske, K.: Der *Bazillus pyocyaneus* als Erreger einer Rhinitis und Meningitis hämorrhagica bei Schweinen. Arb.Kais.Ges.Amt 23, 542 (1906)
34. Korth, H.: Über die Klassifizierung des Genus *Pseudomonas* auf Grund der Farbstoffbildung. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 183, 196 (1961)
35. Korth, H.: Über einen chinasäurehaltigen Nährboden zur Differenzierung und Anreicherung von *Ps.aeruginosa*. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 190, 225 (1963)
36. Kovacs, N.: Identification of *Ps.pyocyanea* by the oxydase reaction. Nature 178, 705 (1956)
37. Köhler, W.: *Pseudomonas aeruginosa* (*Bact.pyocyaneum*) Cytologie, Biochemie und Serologie. Wiss.Zschr.Univ.Rostock, Math.-nat.Reihe 7, 25 (1957/58)
38. Köhler, W.: Differentialdiagnose von *Ps.aeruginosa* durch Cytochromoxydasennachweis (Gaby-Test). Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 176, 476 (1959)
39. Krassilnikov, N.A.: Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten. Gustav Fischer Verlag, Jena (1959)
40. Krüger, A. u. Frank, W.: *Ps.aeruginosa* in der Milch, insbesondere in Vorzugsmilch. Arch.f.Lebensmittelhyg. 12, 274 (1957)

41. Leifson, E.: Staining, shape and arrangement of bacterial flagella.
J.Bact. 62, 377 (1951)
42. Lysenko, O.: Pseudomonas - an attempt at a general classification
J.gen.Microbiol. 25, 379 (1961)
43. Meyer, E.: Ein Fall von Stronyloides-Invasion beim Schwein mit gleichzeitiger Pyocyaneus-bakteriämie.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 22, 661 (1925)
44. Neumann, H.J. u. Seeling, G.: Bacterium pyocyaneum (Ps.aeruginosa) als Mastitiserreger.
Prakt.Tierarzt 245 (1956)
45. Nikodemusz, J.: Ps.fluorescens okozta elémiszermergezes.
Honvedorvos 14/2 126 (1962)
46. Nikodemusz, J., u. Javor, T. u. Fülöp, T.: Sind die Alkohole in dem Bakterienstoffwechsel als Kohlenstoffquelle anwendbar?
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 152, 452 (1951)
47. Nilson, P.O. u. Thörne, H.: Die Frequenz der Pseudomonasmastitis.
Nord.Vet.Med. 15, 239 (1953)
48. Prévot, A.R.: Traité de systematique bactérienne
Dunod Paris (1961)
49. Pulverer, G. u. Korth, H.: Zur Biochemie und Fermentstruktur von Ps. aeruginosa.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 186, 36 (1962)
50. Radaelli, G. u. Perini, G.: Contributo aller studio della mastite bovine per Ps.aeruginosa.
Arch.vet.ital. 11, 273 (1960)
51. Reher, H.D.: Untersuchungen über das Vorkommen und die Bedeutung psychrotoleranter Bakterien für die Qualität und Haltbarkeit der Vorzugsmilch.
Diss. Hannover (1961)
52. Rhodes, M.E.: The characterisation of pseudomonas fluorescens.
J.gen.Microbiol. 21, 221 (1959)
53. Ringen, L.W. u. Drake, Ch.H.: A study of the incidence of ps.aeruginosa from various natural sources.
J.Bact. 64, 841 (1952)
54. Selen, W.A. u. Stark, C.N.: Some characteristics of greenfluorescent pigmentproducing bacteria
J.Bact. 46, 491 (1943)

55. Selenka, F.: Der quantitative Nachweis von *Ps. aeruginosa* im Oberflächenwasser. Arch.Hyg. 144, 627 (1960)
56. Sierra, G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. A.v. Leeuwenhoeck 23, 15 (1957)
57. Simon, R.D.: The use of fermentation reactions and pigmentproduction to differentiate between types of *ps. pyocyanea* and other *pseudomonas* species, especially *fluorescens*. Brit .J.Exp.Path. 37, 494 (1956)
58. Solari, A.A., Herrero, M.M. u. Painera, M.T.: Use of malchite green for staining flagella in bacteria. Appl.Microbiol. 16, 792 (1968)
59. Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. u. Doudoroff, M.: The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study J.gen.Microbiol. 43, 159 (1966)
60. Thomas, S.B.: Sources, incidence and significance of psychrophilic bacteria in milk. Milchwissenschaft 21, 270 (1966)
61. Thörne, H. u. Andren, T.: *Ps.aeruginosa* in konsumtionsmjölk. Medlemsbl.sveriges vet.förb. 16, 680 (1964)
62. Thörne, H. u. Harkansson, J.: Ett utbrott av *pseudomonasmastitis*. Medlemsbl.sveriges vet.förb. 18, 311 (1966)
63. Thörne, H. u. Nilson, P.O.: Pasivande av *ps. aeruginosa* in mjölkprov. Nord.Vet.Med. 14, 547 (1962)
64. Weidenmüller, K.: Über eine Magen-Darminfektion besonderer Art bei schwächlichen Kleinkindern. (*B.pyocyaneus*) Zschr.Kinderheilkd. 63, 190 (1943)
65. Weigt, U.u. Ferking, H.: Zur Verbreitung perakut verlaufender Entzündungen durch ungenügend gereinigte Melkmaschinen. Dtsch.tierärztl.Wschr. 74, 610 (1967)
66. Wöckel, W. u. Eggers, H.: Zur Klinik und Pathologie der *Pyocyaneus*-Infektionen bei Frühgeborenen und Säuglingen Dtsch.med.Wschr. 83, 174 (1958)

Anhang



Abb.1 Ps. fluorescens
Geißelfärbung nach Leifson
Vergr.: ca. 6300 x

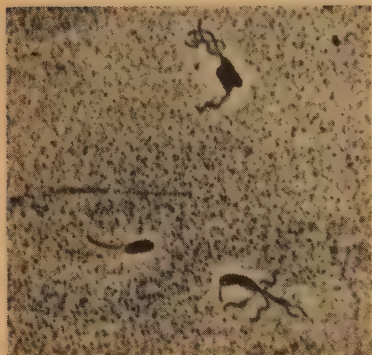


Abb.2 Ps. fluorescens
Geißelfärbung nach Leifson
Vergr.: ca. 6300 x

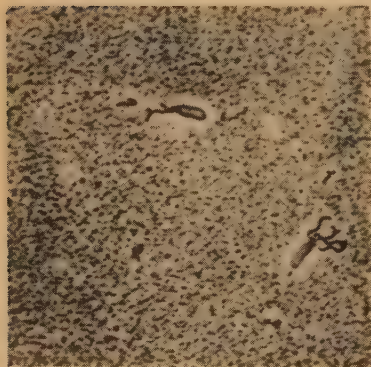


Abb.3 Ps. putida
Geißelfärbung nach Leifson
Vergr.: ca. 6300 x



Abb.4 Ps.aeruginosa
Geißelfärbung nach Solari,
Herrero und Painera
Vergr.: ca. 6300 x



Abb.5 Ps.putrefaciens
Geißelfärbung nach Leifson
Vergr.: ca. 6300 x

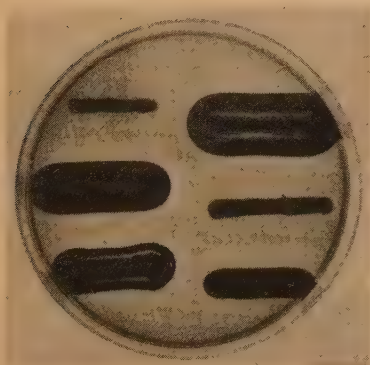


Abb.6 Eigelbreaktion auf dem
Eigelbagar nach Klinge



Abb.7 Kaseolyse im Kaseinagar
nach Frazier und Rupp

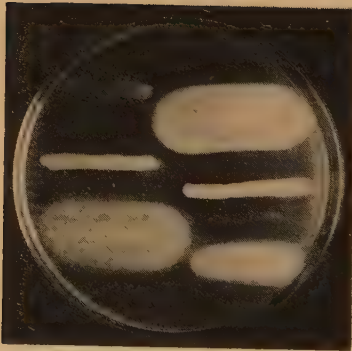


Abb.8 Lipolyse im Medium nach
Sierra

Dem Leiter der Milchabteilung des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, Herrn Oberregierungsveterinär-rat Dr. Kielwein, danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Ratschläge und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Blobel, Direktor des Instituts für Bakteriologie und Immunologie, Gießen, für das rege Interesse an der Arbeit und die hilfreiche Unterstützung .

Dem Vorstand des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, Herrn Reg.Vet. Direktor Prof.Dr. Dedé, danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können.

Ich danke der Stiftung Volkswagenwerk für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 20.8.1941 wurde ich als Sohn des Landwirtes Nikolaus Till und seiner Ehefrau Eva, geb. Harsanyi (Heilmann) in Ofalu/ Ungarn geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule im selben Ort wurde mein Aufnahmeantrag an ein staatliches Gymnasium aus politischen Gründen abgelehnt. Ich arbeitete ein Jahr im elterlichen Betrieb.

Im September 1956 erfolgte meine Aufnahme in das Allgemeine Benediktiner-Gymnasium zu Pannonhalma/Ungarn, wo ich im Juli 1960 die Reifeprüfung bestand.

Auf Grund der politischen Verhältnisse in Ungarn mußte ich anschließend zwei Jahre an dem Städtischen Schlachthof Pecs (Fünfkirchen) als Transportarbeiter tätig sein.

Erst nach dieser Tätigkeit erhielt ich im September 1962 die Zulassung zum Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Budapest.

Nach bestandenem Physikum im Sommersemester 1964 benutzte ich im Januar 1965 einen Besuch bei Verwandten zum Verbleib in der Bundesrepublik.

Im Sommersemester 1965 setzte ich das Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen fort, wo ich im Januar 1968 die Tierärztliche Prüfung bestand.

Vom März 1968 bis April 1969 führte ich als Stipendiat der Stiftung Volkswagenwerk die Untersuchungen für meine Dissertation in der Milchabteilung des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf durch.

Foto-Druck
Chemoprint^{OHG}
Gießen